

Aus dem
Veterinär-Anatomischen Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. H. Geyer)

Arbeit unter Leitung von
Prof. Dr. A. Boos

**Immunhistochemische Untersuchungen zu den
Progesteron-, Östrogen- und Glukokortikoidrezeptoren
in der interplazentomären Uteruswand des Rindes
im peripartalen Zeitraum**

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
MARCEL SCHÄUBLI
Tierarzt
von Bassersdorf/Nürens Dorf ZH

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. A. Boos, Referent
PD Dr. M. Hässig, Korreferent

Zürich 2005

Gewidmet in Liebe

meinem Grossvater und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Summary	9
3	Einleitung	11
4	Literaturübersicht	13
4.1	Der weibliche Genitaltrakt des Rindes.....	13
4.1.1	Interplazentomäre Uteruswand.....	13
4.1.2	Plazentomäre Uteruswand.....	16
4.2	Steroidhormone.....	17
4.2.1	Progesteron.....	18
4.2.2	Östrogene.....	19
4.2.3	Glukokortikoide.....	21
4.3	Steroidhormonrezeptoren.....	23
4.3.1	Steroidhormonrezeptor-Familie.....	23
4.3.2	Aufbau.....	24
4.3.3	Funktionsweise.....	26
4.3.3.1	Ligandaktivierte, nukleäre Transkriptionsfaktoren.....	26
4.3.3.2	Ligandenunabhängige, nukleäre Transkriptionsfaktoren.....	28
4.3.3.3	Membran-assoziierte Steroidhormonrezeptoren.....	29
4.3.4	Untersuchungen zum Vorkommen von Steroidhormonrezeptoren.....	29
5	Material und Methoden	31
5.1	Probengewinnung.....	31
5.1.1	Schlachttiere	31
5.1.2	Tiere unter Sectio cesarea.....	31
5.1.3	Tiere post partum.....	32
5.2	Gruppeneinteilung.....	32
5.3	Progesteronbestimmungen.....	33
5.4	Histologie.....	33

5.4.1	Probenaufarbeitung.....	33
5.4.2	Probenauswahl.....	34
5.5	Immunhistochemische Methoden.....	34
5.5.1	Progesteronrezeptoren.....	35
5.5.2	Östrogenrezeptoren.....	36
5.5.3	Glukokortikoidrezeptoren.....	37
5.6	Auswertung.....	38
5.7	Statistik.....	39
6	Resultate	41
6.1	Progesteronbestimmung.....	41
6.2	Immunhistochemische Befunde.....	41
6.2.1	Progesteronrezeptor-Nachweis.....	41
6.2.2	Östrogenrezeptor-Nachweis.....	46
6.2.3	Glukokortikoidrezeptor-Nachweis.....	51
7	Diskussion	57
7.1	Probenmaterial und Auswertung.....	57
7.2	Progesteronrezeptor-Nachweis.....	58
7.3	Östrogenrezeptor-Nachweis.....	61
7.4	Glukokortikoidrezeptor-Nachweis.....	64
7.5	Schlussfolgerung.....	66
7.6	Ausblick.....	66
8	Literaturverzeichnis	67
9	Anhang	81
10	Danksagung	89

1 Zusammenfassung

Bisherige Studien am Uterus trächtiger Rinder beschäftigten sich vorwiegend mit dem Plazentom; entsprechend spärlich sind die Kenntnisse über die interplazentomäre Uteruswand. Gewebeproben aus dem interplazentomären Bereich von 37 Kühen wurden gesammelt und in zwei Vergleichsgruppen einander gegenüber gestellt. Erstere beinhaltet Tiere im 8. bzw. 9. Trächtigkeitsmonat (Schlachttiere), Tiere mit prämaturnen Kaiserschnitten an den Tagen 275-282 post inseminationem (p. i.) nach Einleitung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ sowie Kaiserschnitt-Tiere nach Dystokie (n=6, 5, 5 und 4 Tiere). Letztere umfasst Tiere mit prämaturn eingeleitetem Kaiserschnitt an den Tagen 269-271 p. i., Tiere mit nicht eingeleitetem Kaiserschnitt und Biopsieproben von Tieren post partum nach Spontangeburt (n=6, 6 und 5 Tiere). Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben wurden immunhistochemisch auf Progesteron- (PR), Östrogen- (ER) und Glukokortikoidrezeptoren (GR) untersucht. PR, ER und GR zeigten ein Zelltyp- und Lokalisations-spezifisches Verteilungsmuster. Der immunreaktive Score (IRS) der PR und ER unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Der GR-IRS im endometrialen Stroma eingeleiteter Kaiserschnitt-Tiere war höher gegenüber den Schlachttieren und den Tieren nach Dystokie. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Geburtseinleitung auf der Ebene der Glukokortikoidrezeptoren in der interplazentomären Uteruswand auswirkt. Die Bedeutung dieser Feststellung muss weiter untersucht werden.

2 Summary

Studies on the uterus of pregnant cattle focus on placentomes. Therefore, the knowledge about the interplacentomal uterine wall is sparse. Interplacentomal uterine wall segments from 37 cows were collected, being eight and nine months pregnant (slaughtered cows) or undergoing a premature caesarean section 275-282 days after insemination and following induction of birth with PGF_{2α} or receiving caesarean sections during severe dystocia (n=6, 5, 5, and 4 animals, respectively). In a second trial cows underwent premature caesarean section 269-271 days after insemination without or with induction of birth (n=6, 6, respectively). In five naturally calving cows endometrial biopsy specimens were gained within 30 min after the expulsion of the calf. Tissues were fixed in formaldehyde and paraffin sections were assessed immunohistochemically for progesterone (PR), estrogen (ER) and glucocorticoid receptors (GR). PR, ER and GR exhibited cell-type- and location-specific distribution patterns. Immunoreactive scores (IRS) for PR and ER did not differ between groups. GR-IRS of endometrial stromal cells were higher in animals undergoing premature caesarean section after induction of birth compared to animals slaughtered during months eight or nine of pregnancy or animals receiving caesarean section following dystocia. Results indicate, that induction of birth is reflected by an increase in GR-IRS of endometrial stromal cells. The significance of this result remains to be elucidated.

3 Einleitung

Eine Vielzahl Arbeitsgruppen haben sich während der letzten Jahrzehnte mit der Gravidität und der Geburt unserer Haussäugetiere auseinander gesetzt. Ein Grossteil der Studien fokussiert entweder auf die endokrinen Vorgänge der beiden Stadien [51] oder aber auf die Plazenta, welche vor allem im Zusammenhang mit der Erforschung der Retentio secundinarum intensiv untersucht wurde [16,54]. Ihre Rolle als Wirkungs- und Bildungsort von Steroidhormonen [44] sowie auch die Verteilung der Steroidhormonrezeptoren in den einzelnen Gewebeschichten [16,54,80,81,82] sind Gegenstand jüngster Forschung.

Die Untersuchung der interplazentomären Uteruswand wurde bis anhin weitgehend vernachlässigt. Die Erforschung des plazentären Gewebes versprach neue Erkenntnisse über die Ursachen der Retentio secundinarum. Zudem wurde die Beteiligung der interkarunkulären Uteruswand an der Aufrechterhaltung der Trächtigkeit bzw. an der Induktion der Geburt mehrheitlich unterschätzt. Zu unrecht, wie dies mittlerweile bereits in mehreren Studien an der interplazentomären Uteruswand gezeigt wurde. In Abhängigkeit vom Gewebe- und Rezeptortyp konnte das dynamische Vorkommen von Steroidhormon- und Prostaglandinrezeptoren während der Trächtigkeit [2,15,54,95] und bei der eingeleiteten Geburt [95] aufgezeigt werden. Dies lässt darauf schliessen, dass auch über eine Regulation der Menge und der Verteilung bestimmter Rezeptoren in der Uteruswand auf die Trächtigkeit und den Geburtsvorgang Einfluss genommen werden kann.

Aufgrund dieser Erkenntnisse hat es sich die vorliegende Studie zum Ziel gemacht, mittels immunhistochemischer Methodik erstmals das Vorkommen, die Verteilung sowie Mengenänderungen von Progesteron-, Östrogen- und Glukokortikoidrezeptoren in der interplazentomären bovinen Uteruswand im peripartalen Zeitraum zu analysieren. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen vergleichend mit den Resultaten immunhistochemischer Studien an der Plazenta betrachtet und soweit möglich in Bezug auf ihre funktionelle Bedeutung interpretiert werden. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, abzuklären,

3 Einleitung

welche endokrine Rolle die interplazentomäre Uteruswand am Ende der Trächtigkeit im Rahmen der Geburtseinleitung einzunehmen vermag und inwieweit das sich peripartal stark verändernde endokrine Umfeld selbst Einfluss auf die entsprechende Rezeptorpopulation nimmt.

4 Literaturübersicht

4.1 Der weibliche Genitaltrakt des Rindes

Die Aufgabe der weiblichen Geschlechtsorgane ist es, befruchtungsfähige Eizellen zu produzieren und dem nach erfolgreicher Befruchtung entstandenen Keimling ein optimales Umfeld für seine Weiterentwicklung zur Geburtsreife zu bieten.

Entsprechend ihren Aufgaben lassen sich die verschiedenen Abschnitte des Genitaltraktes in keimbereitende (Ovarien), keimleitende (Salpinx) und keimbewahrende Organe (Uterus) sowie in Begattungsorgane (Vagina, Vestibulum vaginae, Vulva) unterteilen.

Auf dem keimbewahrenden Uterus, bestehend aus Cervix, Corpus uteri und zwei Hörnern, lastet das Hauptaugenmerk dieser Arbeit. Die Cervix ist ein derbes Gebilde mit meistens vier Querwülsten und grenzt den Uteruskörper von der Scheide ab. Das Corpus uteri liegt bei jungen Tieren im Becken, bei älteren hingegen tritt es unterschiedlich weit in die Bauchhöhle ein, bevor es sich in zwei zuerst parallel verlaufende Hörner aufteilt, die schliesslich divergieren und sich über kranioventral nach kaudodorsal widerhornartig einrollen [56] und in den Eileiter übergehen.

4.1.1 Interplazentomäre Uteruswand

In den bisherigen immunhistochemischen Studien wurde die Untersuchung der interplazentären Uteruswand am Ende der Trächtigkeit und zum Geburtszeitpunkt meist vernachlässigt und der Fokus stattdessen auf das Plazentom gerichtet. Kohtes [54] und Boos et al. [15] befassten sich als einzige mit dem Verlauf der Steroidhormonrezeptoren der dreischichtigen, vereinfacht in Endo-, Myo- und Perimetrium gliederbaren Uteruswand.

Das Endometrium wird in eine Lamina epithelialis und eine Lamina propria unterteilt. Das zyklusabhängig einfache oder mehrreihige Oberflächenepithel besteht aus hochprismatischen Zellen [14], die am distalen Rand Mikrovilli und in der Nähe der Austrittsöffnungen der Uterindrüsen Kinozilien aufweisen [99]. Die Lamina propria (Stroma

endometrialis) ist ein reich kapillarisiertes Gewebe, bestehend aus Fibroblasten und Bindegewebsfasern. Auffallend ist eine zellreiche und faserarme subepitheliale Schicht (Stratum compactum) sowie die faserreichen, konzentrisch angeordneten Bindegewebscheiden um die tubulären, teilweise aufgekäuerten Drüsen, welche die gesamte Lamina propria bis zur Tunica muscularis durchziehen.

Im Verlaufe der Plazentation spielt das Oberflächenepithel eine nicht unwesentliche Rolle und durchläuft diverse morphologische Veränderungen. Vorerst sind die Zellen hochprismatisch, flachen jedoch ab circa dem 18. Trächtigkeitstag auf Grund der Präsenz der Blastocyste im Uterus im Sinne einer ersten mütterlichen Antwort auf die Trächtigkeit ab [52]. Zu Beginn der Einnistung tritt das sich kontinuierlich ausdehnende Chorion im interkarunkulären Bereich in lockeren Kontakt mit dem Epithel. Schon wenige Tage später ist aus dieser lockeren Anhaftung eine engere Verbindung aus sich in benachbarten Trophoblasten verzahnenden maternalen Mikrovilli entstanden. Durch eine zusätzliche Krypten- und Faltenbildung im interplazentomären Bereich kann die verzahnte Oberfläche vergrößert werden, es entstehen sogenannte akzessorische Plazentome, die ab dem 80. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden können [11]. Björkman sieht ihre Funktion darin, einen ungenügenden plazentären Stoffaustausch zu kompensieren und spricht von einer interkotyledonären Plazenta diffusa [10]. An allen Kontaktstellen zwischen fetalem und mütterlichem Gewebe, also auch im Plazentom, können migrierte, binukleäre Trophoblast-Riesenzellen nachgewiesen werden. Sie durchdringen das maternale Epithel und fusionieren mit Epithelzellen zu sogenannten Hybridzellen, welche durch Verschmelzung aus Zellen zweier unterschiedlicher Individuen entstanden sind [76]. Zur Bildung von zwei- und mehrkernigen Riesenzellen ist jedoch nicht nur das fetale, sondern auch das materale Gewebe befähigt [11].

Die Lamina propria ist ein sehr dynamisches Gewebe, welches sich nicht nur während des Zyklus strukturell und funktionell ständig verändert (Sekretions- und Proliferationsphasen), sondern auch während der Gestation einem massiven Umbau unterworfen ist. Die Untersuchungen von Boos et al. [18] betreffend Menge und Verteilungsmuster von Kollagenen vom Typ I, III und IV zeigen dies sehr deutlich. Kollagen vom Typ I liegt zu Beginn der Trächtigkeit als feines Netz unmittelbar unter dem Oberflächenepithel vor und umhüllt die Drüsenmündungen sowie die Gefäße. Die nur einzelne Bindegewebslagen umfassende subepitheliale Schicht verdickt sich signifikant und repräsentiert im fünften Trächtigkeitsmonat das Stratum compactum, bis zur Geburt bildet sie sich wieder gering-

fällig zurück. Vermutlich trägt das Kollagen vom Typ I an dieser Stelle einen wesentlichen Teil zur Erhaltung der Reißfestigkeit des Uterus während der Trächtigkeit bei. In den tieferen Schichten des Stromas kommt dieser Kollagen Typ nur noch in sehr geringen Konzentrationen vor. Kollagen Typ III ist als grobmaschiges Netz im ganzen Stroma vorhanden. Im Vergleich zu Kollagen I liegt Kollagen III vermehrt in tieferen Schichten vor. Gegen die Geburt hin sind jedoch keine mengenmässigen Unterschiede zwischen beiden Kollagentypen mehr feststellbar.

Die Drüsen des Uterus durchlaufen trächtigkeitsbedingte Veränderungen. Sie hypertrophieren und dilatieren zunehmend bis zum Zeitpunkt der Geburt, was ihnen im Zusammenhang mit der massiven Grössenzunahme des Uterus gegen Ende der Trächtigkeit eine etwas unregelmässige Form verleiht. Die ursprünglich im Durchmesser kleineren basalen Drüsenabschnitte wachsen stärker und können in den späten Trächtigkeitsstadien nicht mehr von den oberflächlichen Drüsenanteilen unterschieden werden [108]. Mit zunehmender Grösse steigert sich auch die sekretorische Aktivität der Drüsen, die gemäss Dhaliwal et al. [31] bis anhin im interplazentomären Endometrium massiv unterschätzt wurde. Die Uterindrüsen synthetisieren und sezernieren die Histiotrophe, welche auch als sogenannte Uterinmilch bezeichnet wird. Dieses unter Mithilfe von Enzymen gebildete Drüsensekret wird ergänzt durch Zerfallsprodukte der Schleimhaut und Blutextravasate und wird mittels Phago- bzw. Pinozytose vom Chorionepithel aufgenommen [77]. Die Versuche von Gray et al. [38] mit Knockout-Schafen unterstreichen die Wichtigkeit der Uterindrüsen und ihrer Produkte in Bezug auf Implantation und Weiterentwicklung des Konzeptus.

Das Myometrium besteht aus einer dicken inneren, meist zirkulären und einer äusseren longitudinalen Schicht glatter Muskelzellen, die im Verlaufe der Trächtigkeit vornehmlich durch Hypertrophie der erhöhten mechanischen Belastung gerecht werden [111]. Zusätzlich zu den glatten Muskelfasern kommen modifizierte Fibroblasten vor, die sich insbesondere während der Trächtigkeit in kontraktile Myofibroblasten umwandeln, um so die glatten Muskelzellen zu unterstützen. Nach der Geburt bilden sie sich wieder zurück und synthetisieren Kollagenfasern [57]. Zwischen den beiden Muskellagen des Myometriums liegt das blut- und lymphgefässreiche Stratum vasculosum. Von dieser Schicht aus ziehen, von Nerven begleitet, Gefässe zur Versorgung der Drüsen und des Epithels ins Endometrium.

Die äusserste Lage des Uterus stellt das Perimetrium dar. Loses Bindegewebe, glatte Muskelzellen, zahlreiche Lymph- und Blutgefässe sowie Nerven werden von einem einschichtigen Peritonealepithel (Tunica serosa) bedeckt [68]. Im Bindegewebe konnte vorwiegend Kollagen der Typen I und III nachgewiesen werden. Strukturelle und mengenmässige Veränderungen sind im Verlauf der Trächtigkeit jedoch morphologisch nicht feststellbar [18]. Das Ligamentum latum uteri, welches den Uterus an der dorsolateralen Bauch- und Beckenwand befestigt, geht kontinuierlich ins Peri- und Myometrium über.

4.1.2 Plazentomäre Uteruswand

Die Plazenta des Rindes kann unter Berücksichtigung ihres Verhaltens während der Geburt als adeziduate Plazenta bezeichnet werden: Chorion und Uterusepithel sind vollständig vorhanden (Plazenta epitheliochorialis) und trennen sich bei Abgang der Nachgeburt ohne grössere Gewebsverluste. Wendet man morphologische Kriterien an, so muss die Rinderplazenta auch als Plazenta multiplex seu cotyledonaria bezeichnet werden [77].

Die Funktionen der Plazenta sind vielfältig. Neben einer rein mechanischen Schutzfunktion ermöglicht sie die Versorgung des Feten mit einer stetig wachsenden Nährstoffmenge und produziert Hormone.

Nach dem ersten Trächtigkeitsmonat differenziert sich der feto-maternale Kontakt zu besonders eindrucksvollen multiplen, abgegrenzten Bereichen, in denen spezifische Strukturen, die Plazentome, ausgebildet werden. Den fetalen Teil der Plazentome bilden die Kotyledonen, die sich beim Rind zu zwei Dritteln aus dem Allantochochon und zu einem Drittel aus dem Amniochochon entwickeln [77]. Die Chorionplatte überzieht kappenartig die Karunkeloberfläche und entlässt stark verzweigte Chorionzotten in die Tiefe der Krypten der Uterusschleimhaut. Die Karunkelanlagen sind beim weiblichen Rind bereits während der Fetalphase vorhanden [3]. Karunkeln sind als begrenzte Verdickungen des Endometriums sehr reich an Fibroblasten und gut durchblutet. Beim adulten Rind ordnen sich die knopfförmigen Erhebungen in jedem Uterushorn in vier unregelmässigen Reihen mit je 10-15 Karunkeln an. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass in den Karunkeln, im Gegensatz zum interplazentomären Stroma, keine Drüsen vorhanden sind. Neuere Studien zeigen aber, dass basale Drüsenanteile in die Basis der ansonsten aglandulären Karunkel eindringen [31]. Ebenfalls unterschiedlich verhalten sich Stromazellen karunkulärer und interplazentomärer Herkunft. Obwohl morphologisch

identisch, verfügen die Zellen karunkulärer Herkunft über eine höhere Proliferationsaktivität [107].

Die Lösung der feto-maternalen Verbindung ist nach der Geburt von grosser Wichtigkeit. Geschieht sie nicht termingerecht, spricht man entweder von einem verzögerten Abgang oder aber von einer Retentio secundinarum. Gewöhnlich zeigen Kühe mit Nachgeburtverhalten eine unvollständige und ungleichmässige Ausreifung des Plazentomgewebes, insbesondere der Kryptenepithelien [78].

4.2 Steroidhormone

Die Gruppe der Steroidhormone lässt sich unterteilen in Sexual- und Corticosteroide. Neben dem Ovar, das alle drei Klassen der Sexualsteroidhormone (Progestine, Östrogene, Androgene) synthetisieren kann, sind auch die Trophoblastzellen der Plazenta zur Bildung von Östrogenen und Progesteron befähigt [44]. Von den Nebennieren unterscheidet sich das Ovar diesbezüglich durch die fehlenden Enzyme 21-Hydroxylase und 11 β -Hydroxylase; die Gluco- bzw. Mineralocorticoide können deshalb im Ovar nicht produziert werden und haben ihren Ursprung in der Nebennierenrinde [60].

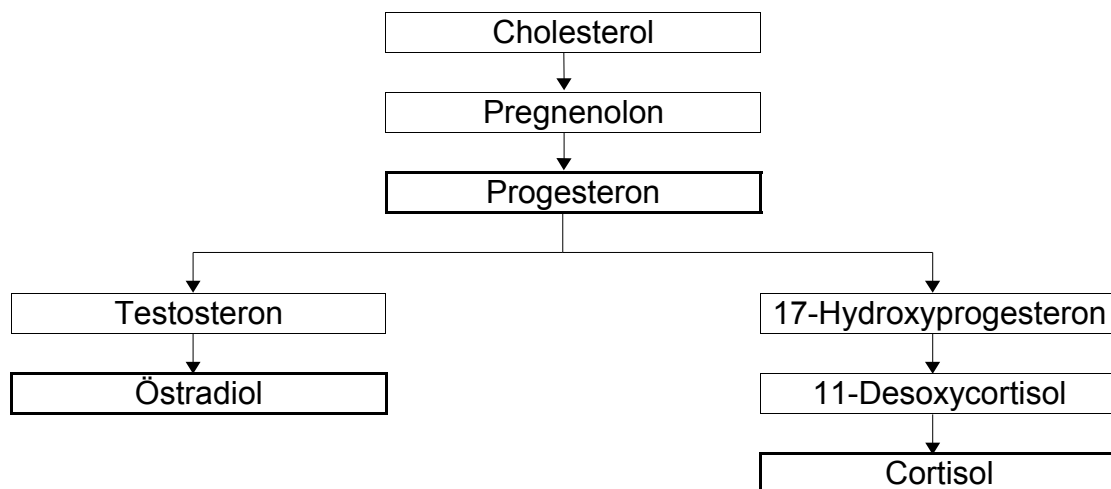


Abbildung 4.1: Synthese von Progesteron, Östradiol und Cortisol aus Cholesterin (modifiziert nach Squires, 2003).

Alle Steroidhormone der Säugetiere leiten sich, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, vom Cholesterin ab [85]. Während ihrer Synthese müssen einige oder alle Kohlenstoffatome der von C-17 im D-Ring des Cholesterins ausgehenden Seitenkette entfernt werden. Dies geschieht in den Mitochondrien durch Hydroxylierung und anschliessende Spaltung der

Bindung zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen. Die Bildung der einzelnen Hormone erfordert zudem die Einführung von Sauerstoffatomen [63].

Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft lassen sich Steroidhormone nur schlecht im Blut lösen, weshalb sie gebunden an Serumbindungsproteine im Blutstrom zu ihren Zielzellen gelangen, wo sie durch einfache Diffusion die Plasmamembran passieren und im Anschluss an ihr spezifisches Rezeptorprotein binden. Die Bindung des Hormons verändert die Konformation des Rezeptors und löst eine weiter unten detaillierter beschriebene Kaskade von Reaktionen aus, an deren Ende die Transkriptionsrate des hormongesteuerten Genproduktes erhöht oder verringert wird.

Die Halbwertszeit im Organismus ist bei allen Steroidhormonen kurz, weshalb für den klinischen Einsatz vielfach strukturell modifizierte, länger wirksame Steroide zum Einsatz kommen. Der enzymatische Abbau erfolgt hauptsächlich in der Leber. Nach Inaktivierung der Steroide durch Einfügen von Hydroxylgruppen und Konjugation mit Glucuron- oder Schwefelsäure werden die Metabolite über den Harn oder Kot ausgeschieden [34].

4.2.1 Progesteron

Progesteron ist das wichtigste natürlich vorkommende Progestin und wird in den Zellen des Gelbkörpers, der Plazenta und der Nebennierenrinde synthetisiert. Der Tabelle 4.1 können die wichtigsten Wirkungen des Progesterons auf die Uteruswand des trächtigen Tieres entnommen werden.

Tabelle 4.1: Wirkung von Progesteron auf die interplazentomäre Uteruswand

Wirkungsort	Wirkungsweise
Endometrium	<ul style="list-style-type: none">• Transformation ins Sekretionsstadium nach östrogener Stimulation• Abnahme der Oxytocinrezeptoren
Myometrium	<ul style="list-style-type: none">• Wachstumsförderung in Verbindung mit Östrogenen• Ruhigstellung des Uterus während Trächtigkeit durch:<ul style="list-style-type: none">- Erhöhung des Membranruhepotenzials- Reduzierte Verfügbarkeit von intrazellulärem Calcium- Abnahme der Gap junctions- Desensibilisierung für Oxytocinwirkung

Um nach erfolgter Befruchtung die Trächtigkeit aufrechterhalten zu können, muss diese vom Muttertier als solche erkannt werden. Als wichtigstes Signal diesbezüglich gilt das im

Trophoblasten des Konzeptus gebildete Interferon tau (IFN- τ). Der antiluteolytische Effekt von IFN- τ verlängert die Lebensdauer des zyklischen Gelbkörpers durch Supprimierung der normalen pulsatilen Freisetzung des uterinen Prostaglandin F_{2 α} [29]. Als Folge davon fällt die Produktion von Progesteron nicht ab, sondern bleibt im Corpus luteum graviditatis über die gesamte Dauer der Trächtigkeit bestimmend. In den ersten drei Monaten der Trächtigkeit werden im Blutplasma durchschnittliche Progesteronwerte von 9,4 ng/ml erreicht. Im vierten Trächtigkeitsmonat fallen die Progesteronwerte signifikant ab, bleiben aber auf tieferem Niveau bis kurz vor der Geburt konstant [35]. Auch die vorübergehend in der Plazenta produzierten geringen Progesteronmengen vermögen in dieser Zeit keine grösseren Schwankungen im peripheren Blut-Progesteronspiegel zu bewirken. Bisher konnten für die placentären Gestagene keine Zielorgane eruiert werden, es wird folglich angenommen, dass sie als auto- oder parakrine Faktoren wirksam sind [44].

Kindahl et al. [51] beschreiben einen zweiphasigen Progesteronabfall, beginnend im letzten Trächtigkeitsmonat. Die erste Reduktion um circa 20% erstreckt sich über drei Wochen und resultiert aus der Aktivierung einer Reihe von Enzymen. Auslöser ist der am Ende der Trächtigkeit steigende Plasma-Cortisolspiegel, welcher über die Induktion des Enzyms Zytochrom P450_{C17} die 17 α -Hydroxylase aktiviert [104] und somit in der fetoplacentären Einheit indirekt die Metabolisierung von Progesteron zu Östrogenen fördert. Der zweite abruptere, beinahe vollständige Einbruch der Progesteronwerte findet während der letzten zwei bis drei Trächtigkeitstage statt und ist auf die präpartale Luteolyse zurückzuführen [51]. Während Birgel et al. [9] diesen zweiphasigen Abfall bestätigen, beschreiben andere Autoren zwischen dem 7. und 5. Tag ante partum eine vorübergehende, geringe Erhöhung (Abbildung 4.2) der Progesteronwerte [35].

Die Abnahme des Progesteron-Östrogen-Verhältnisses stellt die bedeutendste Veränderung im Zusammenhang mit der Geburt dar. Mit dem Absinken des Progesteronspiegels entfällt der Progesteronblock und das Myometrium erlangt nach langer Zeit der Ruhigstellung wieder die Fähigkeit auf kontraktile Stimulation zu reagieren; eine wichtige Voraussetzung für den komplikationslosen Ablauf des Geburtsvorganges.

4.2.2 Östrogene

Die wichtigsten biologisch aktiven Östrogene sind Östradiol-17 β , Östron und Östriol. Ihre Bildung im weiblichen Organismus erfolgt in den Granulosazellen der Ovarialfollikel, in der Plazenta und in der Nebennierenrinde. Eine Zusammenstellung der Östrogenwirkungen

auf die Uteruswand beim trächtigen Tier ist in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Beim Rind gilt das fetale Trophoblastgewebe, d.h. die Pars cotyledonaria im Plazentom während der Gravidität als Ort der Östrogensynthese. Es produziert anfänglich hauptsächlich konjugierte Formen von Östron und Östradiol-17 α , so dass die Blutspiegel der konjugierten Östrogene lange Zeit diejenigen der freien deutlich übersteigen [34]. Eine lokale uterine Östrogenproduktion kann bereits ab dem 33. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden [44]. Im mütterlichen Blut hingegen beginnt der Östronsulfat-Spiegel erst zwischen dem 70. und 100. Tag messbar zu steigen und erreicht in den letzten 20 Trächtigkeitstagen ein Plateau [51]. Die Östron-Konzentrationen entwickeln sich bis circa vier Wochen vor der Geburt auf einem 10-15fach tieferen Niveau praktisch parallel [43], steigen dann aber massiv an und erreichen unmittelbar vor der Geburt beinahe äquimolare Konzentrationen. Etwas protrahiert, ansonsten aber ähnlich entwickelt sich auch das konjugierte Östradiol (17 α) [34]. Eissa et al. [35] beschreiben tiefe Gesamtöstrogen-Konzentrationen von durchschnittlich 24,8 pg/ml bis zum dritten Trächtigkeitsmonat, die anschliessend bis Monat sechs kontinuierlich auf Werte von 178,2 pg/ml ansteigen, um welche sie bis kurz vor den Geburtszeitpunkt nur noch geringgradig schwanken. Für den Zeitraum vom Beginn der Bildung der plazentären Östrogene und der späten Trächtigkeit konnte bis anhin, im Gegensatz zum Zeitfenster unmittelbar vor der Geburt, weder eine biologische Funktion noch ein Zielorgan ermittelt werden [44].

Tabelle 4.2: Wirkung von Östrogen auf die interplazentomäre Uteruswand

Wirkungsort	Wirkungsweise
Endometrium	• Ausbildung von Oxytocin- und Prostaglandinrezeptoren
Myometrium	• Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur • Erhöhung der Kontraktilität am Ende der Trächtigkeit durch: <ul style="list-style-type: none">- Senkung des Membranruhepotenzials- Ausbildung von Gap junctions- Sensibilisierung für Oxytocin und Prostaglandine- Steigerung der Synthese von kontraktilen Proteinen

Im Gegensatz zu den konjugierten Östrogenen steigt die Konzentration der freien Östrogene (Östron, Östradiol-17 α , Östradiol-17 β) erst in den letzten 20 bis 30 Tagen vor der Geburt, dann allerdings deutlich und sehr rasch [34]. Eissa et al. [35] registrierten in den letzten 6 Tagen stark steigende, am Tag der Geburt bei 4604 pg/ml gipfelnde Ge-

samtöstrogen-Konzentrationen, welche 12 Stunden später bereits wieder markant abgesunken sind (Abbildung 4.2). Einen ähnlichen Verlauf zeigen auch Hoffmann et al. [43] für das freie Östron und gehen davon aus, dass die vermehrte Sekretion von freiem Östron auf die Aktivierung des Zytochrom P450_{C17} zurückzuführen ist.

Gestützt auf klinische Beobachtungen darf davon ausgegangen werden, dass die hohen Plasmaspiegel an freien Östrogenen geburtsvorbereitende Funktionen, wie die Stimulierung der Myometriumsaktivität, die Reifung der Plazenta sowie die Erschlaffung des Geburtskanals übernehmen [44]. Die gesteigerte Myometriumsaktivität ist unter anderem eine Folge der durch die Östrogene begünstigten Prostaglandin- und Oxytocinbildung sowie der verstärkten Expression ihrer Rezeptoren in den Myometriumszellen [49].

4.2.3 Glukokortikoide

Cortisol ist bei den meisten Säugetieren das Glukokortikoid mit der höchsten biologischen Aktivität. Die Produktion findet unabhängig voneinander in der Nebennierenrinde sowohl des Feten und als auch des Muttertieres statt.

Studien zum Verlauf des Cortisolspiegels über die gesamte Trächtigkeit sind widersprüchlich und nur in geringer Zahl vorhanden. Die voneinander abweichenden Ergebnisse lassen sich zum Teil mit der variierenden Art bzw. Zeit der Blutentnahme erklären, welche den direkten Vergleich erschwert [47]. Patel et al. [65] registrierten bei mit einem bzw. zwei Kälbern trächtigen Kühen über die gesamte Gestation basale Cortisolwerte, die erst zwei Tage präpartum signifikant ansteigen. Die Arbeit von Eissa et al. [35] hingegen zeigt einen deutlich davon abweichenden Verlauf des Cortisolspiegels. Nach einer dreimonatigen Phase relativ hoher Durchschnittswerte kommt es im vierten Monat zu einem signifikanten Abfall auf 4,3 ng/ml. Ab dem fünften und bis zum neunten Monat pendeln sich die Cortisolwerte auf ungefähr 3 ng/ml ein.

Die Geburt eines ausgereiften Feten setzt einen Mechanismus voraus, der die fetale Entwicklung und die zur Geburt führenden Vorgänge koordiniert. Beim Rind konnte das in der fetalen Nebennierenrinde synthetisierte Cortisol eindeutig als synchronisierender Faktor identifiziert werden [49]. Es ist nicht nur für die Organreifung am Trächtigkeitsende verantwortlich, sondern induziert zusätzlich den Geburtsvorgang. Weshalb vor der Geburt die ACTH-Produktion im Hypophysenvorderlappen des Feten ansteigt und über eine Stimulierung der Nebennierenrinde die Cortisolproduktion steigert, ist ungeklärt; neben neuronalen Reifungsprozessen im Nucleus paraventricularis [104] wird auch eine Stimu-

4 Literaturübersicht

lation durch Hormone mit neuroendokriner Aktivität, wie zum Beispiel Östradiol-17 β [69] diskutiert. Die Cortisol-Freisetzung ihrerseits induziert im fetalen Trophoblastgewebe die Induktion der Typ 2 Prostaglandin-Synthase (PGHS-II) und somit die Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂). Das plazentäre PGE₂ steigert in der Folge die Östrogenproduktion in der Plazenta. Diese steigenden Östrogenspiegel sind als letztes Glied der präpartalen Ereignisse für die Induktion der PGHS-II im mütterlichen Endometrium und dem daraus resultierenden PGF_{2 α} -Anstieg, welcher zur präpartalen Luteolyse mit den oben beschriebenen Folgen führt, verantwortlich [102]. Da nur eine kleine Fraktion des fetalen Cortisols die Plazenta passieren kann [32], ist der starke Cortisolanstieg im Muttertier um den Geburtszeitpunkt auf eine gesteigerte mütterliche Synthese zurückzuführen. Anders als beim Feten sind jedoch beim Muttertier keine die Geburt steuernden Funktionen des Cortisols bekannt [70]. Die meisten Autoren beschreiben einen starken Cortisol-Anstieg beginnend am letzten [35] oder zweitletzten [45] Tag vor der Geburt mit einem Maximum während der Expulsion des Feten und anschliessend raschem Abfall (Abbildung 4.2).

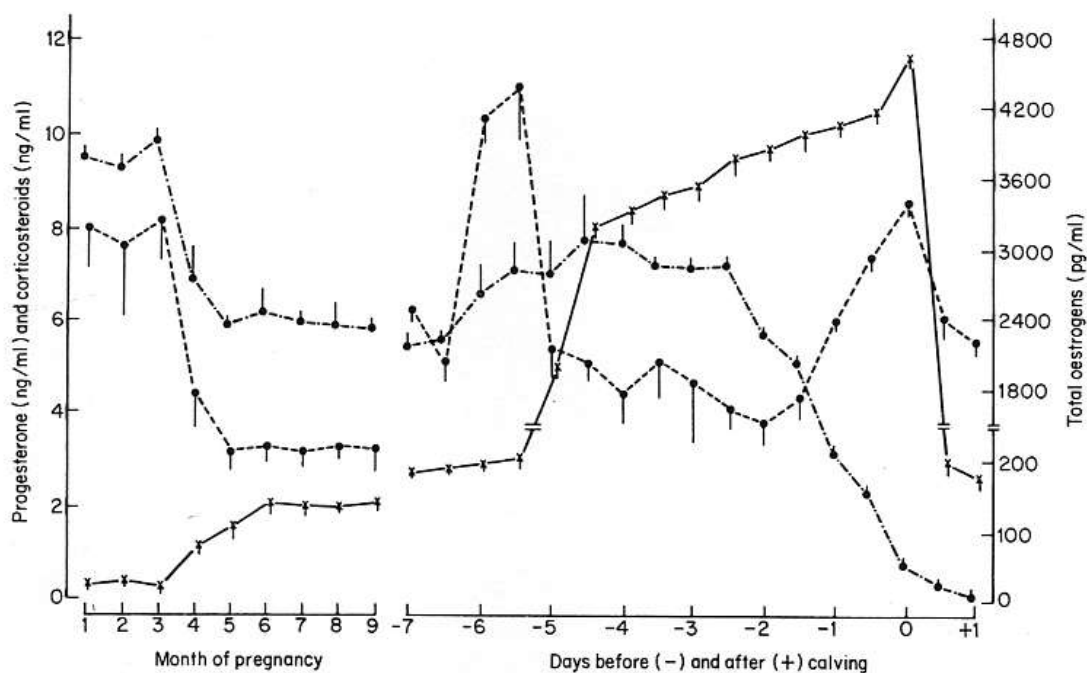


Abbildung 4.2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasmakonzentrationen von Progesteron (-----), Gesamtöstrogenen (—) und Kortikosteroiden (-----) während der Trächtigkeit und im peripartalen Zeitraum (aus Eissa et al., 1990)

Die steigenden Cortisol-Spiegel im Muttertier zum Ende der Trächtigkeit könnten für die beschleunigte Euteranbildung und die Induktion der Laktation wichtig sein; der kurz dauernde Peak während der Expulsion ist damit aber nicht zu erklären. Er ist höchstwahrscheinlich

scheinlich durch den die Geburt begleitenden Stress und Schmerz bedingt [47].

4.3 Steroidhormonrezeptoren

Im Gegensatz zu anderen Hormonen binden die Steroidhormone in der Regel nicht an Rezeptoren auf der Plasmamembran, sondern treten im Zellinnern mit ihren Rezeptoren in Kontakt und beeinflussen im Komplex mit dem Rezeptor als sogenannte Transaktivatoren die Transkription.

4.3.1 Steroidhormonrezeptor-Familie

Die Steroidhormonrezeptor-Familie stellt die grösste bekannte Familie der Transkriptionsfaktoren bei den Eukaryonten dar. Sie beinhaltet neben den Rezeptoren für die Steroidhormone Progesteron (PR), Östrogene (ER), Glukokortikoide (GR), Mineralocorticoide (MR) und Androgene (AR) auch Schilddrüsenhormon-Rezeptoren (TR), Vitamin D-Rezeptoren (VDR), Vitamin A-Rezeptoren (RAR), Retinoid X-Rezeptor (RXR), Ecdyson-Rezeptoren (EcR) sowie die grosse Gruppe der Orphan-Rezeptoren, deren Liganden und/oder Funktionen unbekannt sind und ihnen zu ihrem Namen verholfen haben [91].

Tabelle 4.3: Einteilung der Steroidhormonrezeptoren (modifiziert nach Walters und Nemere, 2004)

	inaktiver Steroidhormonrezeptor		aktiver Steroidhormonrezeptor	
	Lokalisation	HSP-Komplex	Homodimer	Heterodimer
Klasse 1				
ER	Kern	+	+	-
PR	Kern	+	+	-
GR	Zytoplasma	+	+	-
Klasse 2				
TR	Kern/HRE	-	-	RXR
VDR	Kern/HRE	-	-	RXR
RAR	Kern/HRE	-	-	RXR
RXR	Kern/HRE	-	-	Verschiedene

HRE = Hormon-Antwort-Element; HSP = Hitzeschockproteine, weitere Abkürzungen siehe Text

Die Rezeptorfamilie lässt sich nach funktionellen Gesichtspunkten in 2 Klassen einteilen (Tabelle 4.3). Diese Einteilung stützt sich einerseits auf die in Abwesenheit ihres Liganden vorhandene, bzw. fehlende Komplexbildung der Rezeptoren mit den Hitzeschockproteinen (HSP) und hängt andererseits davon ab, ob die Rezeptoren in Form von Homo- oder

Heterodimeren an die DNA binden [96].

4.3.2 Aufbau

Alle Steroidhormonrezeptoren sind modulare, aus den sechs Domänen A/B, C, D, E und F aufgebaute Proteine (Abbildung 4.3). Jede dieser Domänen hat eine charakteristische Struktur und spezifische Funktionen. Während alle Rezeptoren eine DNA- und eine hormonbindende Domäne enthalten, wurden die übrigen Funktionen aus Studien an verschiedenen Rezeptoren zusammengetragen und können folglich bei einzelnen Rezeptortypen fehlen [96].

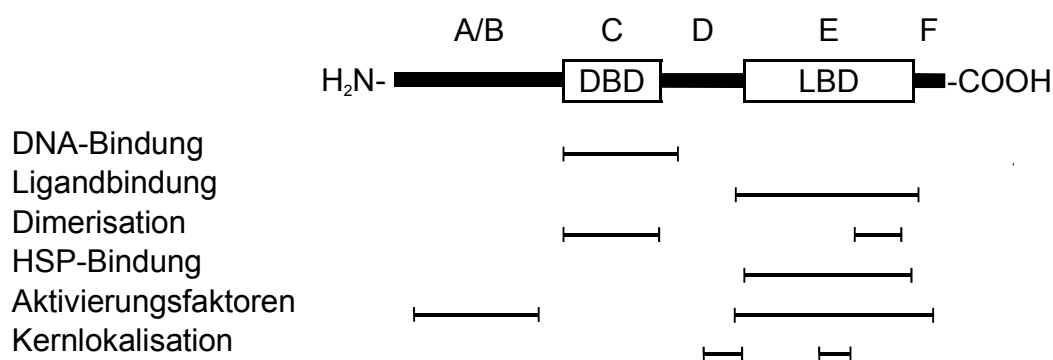


Abbildung 4.3: Funktionelle Domänen der Steroidhormonrezeptoren (modifiziert nach Weigel, 1996)

Die Länge der aminoterminal gelegenen A/B Domäne variiert innerhalb der Steroidhormonrezeptor-Familie stark; beim ER ist sie deutlich ausgeprägt, während sie beim VDR vollständig fehlt [94]. Über ihre sekundäre und v.a. tertiäre Struktur ist bei sämtlichen Steroidhormonrezeptoren, trotz beträchtlichen Anstrengungen, wenig bekannt. Eindeutig identifiziert hingegen wurde die regulatorische Funktion der A/B Domäne mit der Lokalisation des potenten Aktivierungsfaktors 1 (AF1), der eine wichtige Rolle in der Steuerung der rezeptorvermittelten Transkription übernimmt [55].

Die DNA bindende Domäne (C-Domäne, DBD) schliesst carboxyterminal an die regulatorische Region an. Ihre Aminosäuresequenz ist innerhalb der Steroidhormonrezeptor-Familie am stärksten konserviert; besondere Beachtung diesbezüglich verdienen die acht Cysteinmoleküle, von denen je vier an das gleiche Zn⁺⁺-Ion binden und so die Ausbildung der zwei, für die DBD charakteristischen Zink-Finger in Form einer Proteinschleife ermöglichen. Die beiden Zink-Finger sind als voneinander abhängige Subdomänen zu betrachten, welche sich strukturell und funktionell unterscheiden. Die α -Helix der ersten

Subdomäne ist hauptsächlich für die Interaktion mit dem entsprechenden Hormon-Antwort-Element (HRE) verantwortlich [55]. In der sogenannten P-Box des ER identifizierten Mader et al. [59] drei essentielle Aminosäuren, die aufgrund ihrer Interaktion mit den Desoxynukleotiden und ihrer der grossen Furche der DNA angepassten Struktur für die Erkennung des Östrogen-Antwort-Elements (ERE) unabdingbar sind [91]. Auch für PR und GR sind die spezifischen Aminosäuren der P-box bekannt. Die aus fünf Aminosäuren bestehende zweite Subdomäne, D-Box genannt, bewerkstelligt die Bindung an die Phosphate des DNA-Rückgrats und gilt als Kopplungsstelle bei der Zusammenlagerung der aktivierten Rezeptoren zu Dimeren [55].

Die Hinge-Region (D-Domäne) liegt zwischen der DNA- und der Hormon-Bindungsdomäne. Sie enthält beim PR und GR ein Kernlokalisierungssignal [91]. Dieses ermöglicht es dem Rezeptor entweder aufgrund seiner Wechselwirkungen mit Bestandteilen der Kernmembranporen in den Kern einzutreten oder es fixiert den Rezeptor nach der passiven Diffusion durch Bindung an intranukleäre Komponenten im Kern [41]. Ausserdem ist das Kernlokalisierungssignal bei gewissen Rezeptoren an der DNA-Bindung beteiligt [100].

Am carboxyterminalen Ende des Rezeptors liegen die Domänen E und F. Während bisher keine Funktionen von Domäne F bekannt sind, ist die ligandbindende Domäne (LBD) funktionell sehr komplex [91]. Ihr hormonbindender Anteil zeigt bei allen Vertretern der Steroidhormonrezeptoren eine ähnliche Tertiärstruktur, bestehend aus 11 - 13 dreischichtig angeordneten α -Helices (H) sowie einigen β -Faltblättern, die zusammen um eine lipophile Bindungshöhle angeordnet sind [103], deren Spezifität in erster Linie abhängig vom Vorkommen bestimmter Aminosäuren-Seitenketten ist [100]. Einzelne α -Helices der LBD haben zusätzliche Funktionen: Die H11 zweier Monomere bilden durch Ineinandergreifen bei der Homodimerisation eine starre Verbindung aus und H12 ist, als Aktivierungsfaktor 2 (AF2), erforderlich für die ligandinduzierte Interaktion mit einer Vielzahl von Coaktivatoren der Transkription [21]. Zudem trägt auch die LBD ein Kernlokalisierungssignal [91] und ist im inaktivierten Zustand Bindungsstelle für eine Reihe von Hitzeschockproteinen [55].

Von sämtlichen in dieser Studie untersuchten Rezeptoren existieren Isoformen. Die Isoformen A bzw. B des Progesteronrezeptors sind im gleichen Gen codiert, die Initiation der Transkription findet jedoch an unterschiedlichen Stellen statt, so dass der humane PR-B am aminoterminalen Ende ein zusätzliches, 164 Aminosäuren langes Fragment besitzt

[66], auf dem ein dritter Aktivierungsfaktor (AF3) lokalisiert ist [74]. Der PR-A vermag, im Vergleich mit dem PR-B, die Transkription nur geringgradig zu aktivieren, dafür ist er in der Lage die Transaktivierung der anderen Steroidhormonrezeptoren zu hemmen [66]. Mehr als 30 Jahre nach dem ER α konnten Rosenfeld et al. [73] im Ovarialfollikel des Rinds den ER β nachweisen. Die beiden Isoformen werden von verschiedenen, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten Genen kodiert. Trotz starker Homologie der DBD zeigen sie abweichende und unter gewissen Umständen sogar gegenteilige Wirkungsweisen [98]. Auch der humane GR wird infolge unterschiedlichem "Splicing" in zwei Formen exprimiert. Die α -Form stellt den klassischen, durch Glukokortikoide aktivierbaren GR dar, während die im C-Terminus abweichende β -Form keine Glukokortikoide bindet, dafür aber die Aktivität des GR α hemmen kann [6].

4.3.3 Funktionsweise

Steroidhormonrezeptoren können auf verschiedene Arten aktiviert werden und unterschiedliche Funktionen entfalten.

4.3.3.1 Ligandaktivierte, nukleäre Transkriptionsfaktoren

Die am besten bekannte und in den letzten 50 Jahren am intensivsten erforschte Art, ihre Wirkung zu entfalten, führt bei den Steroidhormonen über die Aktivierung ligandspezifischer Transkriptionsfaktoren zu einer Induktion bzw. Repression der Gentranskription [94].

Der inaktive Steroidhormonrezeptor liegt, komplexiert mit den Hitzeschockproteinen (HSP) 90, 70 und 56 [91], im Zytoplasma (GR) bzw. im Kern (ER, PR) vor [96]. Die HSP halten den Rezeptor in einer Konformation, die die Bindung eines spezifischen Liganden zur Aktivierung des Rezeptors erlaubt [7]. Die Hormonbindung induziert im Rezeptor eine Konformationsänderung, welche einerseits zur Dissoziation der HSP führt [37] und andererseits, durch Exposition bestimmter Kopplungsstellen, die Homodimerisation begünstigt [91]. Als Dimere binden die Rezeptoren mit gegenüber den Monomeren deutlich gesteigerter Affinität [91] an spezielle, Hormon-Antwort-Elemente (HRE) genannte, DNA-Abschnitte (Abbildung 4.4). Da die Rezeptoren als Dimere binden, muss es sich bei den aus fünf bis sechs Basenpaaren bestehenden DNA-Erkennungssequenzen entweder um direkte oder seitenverkehrte Wiederholungen handeln [91]. Die Sequenzen der HRE weichen, trotz der völlig unterschiedlichen Hormonwirkungen, nur wenig von einander ab

und sind teilweise sogar identisch. Die geringfügigen Abweichungen von der Konsensus-Sequenz scheinen für bislang unverstandene regulatorische Funktionen verantwortlich zu sein [94]. Der Hauptunterschied zwischen den HRE der verschiedenen Steroidhormone liegt hingegen in der Anzahl "Spacer"-Nukleotide zwischen den beiden Erkennungssequenzen [93]. Diese konservierte Spacer-Sequenz besteht beim Östrogen- bzw. Glucocorticoidrezeptor aus drei Basenpaaren, welche die Zentren der beiden Erkennungssequenzen in einem Abstand von neun Basenpaaren halten, was beinahe einer Umdrehung der DNA-Helix entspricht. Folglich kommen die beiden DBD auf die selbe Seite des DNA-Doppelstrangs zu liegen [55]. Weiter bestimmt die Länge des Spacers Form und Grösse der Rezeptordimere, welche zum entsprechenden HRE passen [94].

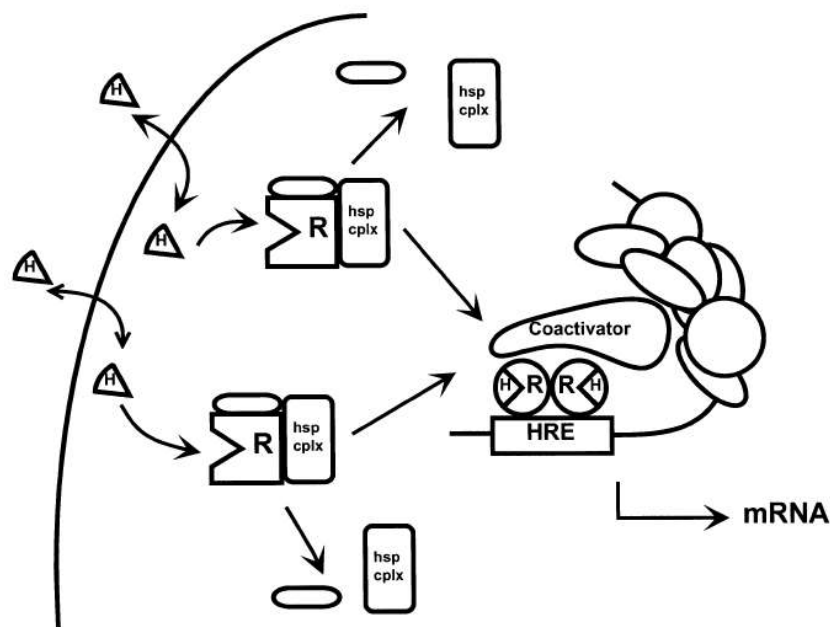


Abbildung 4.4: Aktivierung eines Steroidhormonrezeptors (nach Weigel, 1998)

Die HRE sind als induzierbare DNA-Sequenzen, die die Transkription eines Gens verstärken können zu verstehen. Die Steroidhormonrezeptoren regulieren die Transkription jedoch nicht allein, sondern werden von einer Reihe Kofaktoren (Koaktivatoren, Korepressoren, Mediatoren) unterstützt [94], welche die Interaktion zwischen den an die DNA gebundenen Rezeptoren und den basalen sowie den sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren regulieren [7]. Der Koaktivator-Komplex ist nur kurzlebig und hauptsächlich für die Entwindung der DNA zuständig; eine wichtige Voraussetzung vor dem Start

der Transkription. Viele der beteiligten Koaktivatoren zeigen Histon-Azetylase-Aktivität [105], aber auch Methylase- bzw. Helicase-Aktivitäten kommen vor [86]. Nach der Auflockerung der DNA-Struktur dissoziiert der Koaktivator-Komplex und der Mediator-Komplex wird rekrutiert. Zusammengesetzt aus 9 - 14 stark konservierten Proteinen ist er für den letzten und entscheidenden Schritt, die Aktivierung der Polymerase im Transkriptionskomplex verantwortlich [94], womit die forcierte Expression des Zielgens starten kann.

4.3.3.2 Ligandenunabhängige, nukleäre Transkriptionsfaktoren

Für die Aktivierung von Steroidhormonrezeptoren sind Steroide nicht zwingend nötig. Alternative, ligandenunabhängige Aktivierungsmöglichkeiten wurden in den letzten Jahren in verschiedenen Studien intensiv erforscht.

Die Phosphorylierung der Steroidhormonrezeptoren beeinflusst die DNA-Bindung (positiv oder negativ), die Kernverlagerung, die Interaktion mit anderen Proteinen sowie die Transaktivierung des Rezeptors und ist, da es sich bei den Steroidhormonrezeptoren um Phosphorproteine handelt, schon beim klassischen, ligandabhängigen Aktivierungsweg von grosser Bedeutung [96]. Ausser dem Glukokortikoidrezeptor, der gegenüber einer ligandunabhängigen Aktivierung refraktär zu sein scheint, lassen sich alle Steroidhormonrezeptoren in Abhängigkeit von der Zellpopulation, des Promotors und des Signalweges auch ohne Ligand aktivieren [97].

Denner et al. [30] gelang es erstmals den PR von Hühnern durch Zugabe von 8-bromo-cAMP (stimuliert Proteinkinase A) bzw. Okadasäure (hemmt die Phosphatasen 1 und 2a) auch ohne die Anwesenheit von Progesteron zu aktivieren und sie bewiesen damit, dass Steroidhormonrezeptoren auch ohne Ligand, nur durch Phosphorylierung aktiviert werden können. Tatsächlich verändern alle Faktoren, welche Rezeptoren ohne Hormoneinfluss zu aktivieren vermögen, die Kinase- bzw. Phosphataseaktivität, so dass die Phosphorylierung des Rezeptors und der mit ihm assoziierten Proteine als entscheidender Schritt bei der ligandunabhängigen Aktivierung angesehen werden kann [97]. Dass die Phosphorylierung auslösende Signal wird von Membran-Rezeptoren vermittelt und es konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene, natürlich vorkommende Substanzen, wie zum Beispiel der Neurotransmitter Dopamin [67] oder Wachstumsfaktoren (z.B. Epidermal-growth-factor) [110], über ihre Rezeptoren den ligandunabhängigen Signalweg induzieren können. Trotzdem handelt es sich bei der Rezeptor-Aktivierung unabhängig von einem Hormon um kein generelles Phänomen, da der Prozess zusätzlich von

zellspezifischen Faktoren abhängig zu sein scheint [97].

4.3.3.3 Membran-assoziierte Steroidhormonrezeptoren

Die Suche nach membrangebundenen Steroidhormonrezeptoren begann, nachdem Phänomene beobachtet wurden, deren Resultate aufgrund des raschen Ablaufs nicht auf eine Genregulation zurückgeführt werden konnte [94]. Solche nicht-genomischen Effekte sind bis heute in den verschiedensten Gewebetypen und Tierarten sowie für alle Klassen der Steroidhormone beschrieben worden [20] und es gilt als erwiesen, dass Steroidhormone ihre Wirkung auch unabhängig von der de-novo-RNA- bzw. Proteinsynthese entfalten können.

Bis anhin konnten zwei Gruppen von membrangebundenen Steroidhormonrezeptoren isoliert werden: Einerseits handelt es sich um Äquivalente bzw. Varianten des klassischen Kernrezeptors, andererseits um Proteine ohne jegliche Verwandtschaft mit dem klassischen Kernrezeptor [94]. In den letzten 20 Jahren wurde eine Reihe potenziell möglicher Mechanismen, die an der Signalübertragung beteiligt sein könnten, diskutiert; es konnte jedoch kein einheitlicher Signalübertragungsweg eruiert werden [36].

4.3.4 Untersuchungen zum Vorkommen von Steroidhormonrezeptoren

Mit der Endokrinologie der Gravidität und der Geburt haben sich viele Untersuchungen (siehe Kap. 4.2) beschäftigt und auch über das Vorkommen und die Verteilung der Steroidhormonrezeptoren im Plazentom wurde in den vergangenen Jahren viel publiziert. Einzig die interplazentomäre Uteruswand, auf der das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lastet, wurde bis anhin nur rudimentär erforscht.

Kohtes [15,54] untersuchte im Rahmen seiner immunhistochemischen Arbeit die interplazentomäre Uteruswand von jeweils zwei Schlachtrindern pro Trächtigkeitsmonat bezüglich Vorkommen und Verteilung von Steroidhormonrezeptoren. Während der gesamten Trächtigkeit konnten keine PR im Oberflächenepithel beobachtet werden. Im endometrialen Bindegewebe und im Myometrium veränderte sich die Progesteronrezeptormenge über die gesamte Dauer kaum, während im Drüsenepithel nur in den ersten beiden und bei einigen Tieren auch in den letzten Trächtigkeitsmonaten PR nachweisbar waren. ER konnten während des gesamten Untersuchungszeitraums im Oberflächenepithel, Bindegewebe, Drüsenepithel und im Myometrium dargestellt werden. Im Endometrium ist die Rezeptorzahl im ersten Trächtigkeitsdrittel am grössten und sinkt

mit fortschreitender Trächtigkeitsdauer ab. Bei der immunhistochemischen Anfärbung der GR fand Kohtes in allen Stadien positive Zellkerne im Mündungsbereich der Uterindrüsen. Der Anteil der positiven Oberflächenepithelzellen steigerte sich im Laufe der Trächtigkeit, wobei im Oberflächenepithel ab dem 6. Trächtigkeitsmonat alle Zellkerne GR enthielten.

Die nachgewiesenen Mengen an Rezeptoren zeigen vom Trächtigkeitszeitpunkt abhängige, zell- und lokalisationsspezifische Verteilungsmuster in der Uteruswand des Rindes, was möglicherweise auf eine spezifische Einflussnahme der Steroidhormone auf die Wachstums- und Reifungsvorgänge der verschiedenen Kompartimente während der Trächtigkeit und der Geburt hinweist.

5 Material und Methoden

5.1 Probengewinnung

Sämtliche Proben, welche im Rahmen dieser Untersuchungen gesammelt wurden, stammen von den Rinderrassen "Deutsche Schwarzbunte" und "Holstein Friesian". Die Probanden können in drei Gruppen eingeteilt werden: Schlachttiere, Tiere unter Sectio cesarea und Tiere post partum. Die unterschiedliche Art der Probenerhebung wird im Folgenden erklärt.

5.1.1 Schlachttiere

Diese Proben stammen aus der Schlachtereierosding GmbH & Co. KG in Gleidingen, Deutschland. Hochträchtigen, zur Schlachtbank geführten Kühen wurde spätestens 30 Minuten nach der Betäubung durch einen Bolzenschuss und einer kurzen makroskopischen Untersuchung der Gebärmutter ein Gewebequerschnitt durch die interplazentomäre Uteruswand entnommen. In einigen Fällen war es möglich neben der Uteruswand auch die fetalen Membranen zu gewinnen. Um das Trächtigkeitsstadium genau bestimmen zu können, wurde die Scheitel-Steiss-Länge der Feten bestimmt und diese anschliessend nach Schnorr und Kressin [77] einem Trächtigkeitsmonat zugeordnet (Tabelle 5.1). Von den elf geschlachteten Kühen konnten sechs dem achten und fünf dem neunten Trächtigkeitsmonat zugeteilt werden.

Tabelle 5.1: Altersbeurteilung beim Rinderfetus

Trächtigkeitsmonat	Gewicht (kg)	Scheitel-Steiss-Länge (cm)
8	15 – 25	69
9	20 – 45	81

5.1.2 Tiere unter Sectio cesarea

Während den von der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführten studentischen Übungen (Sectio cesarea) konnten diese

Proben gesammelt werden. Die Querschnitte durch die interplazentomäre Uteruswand wurden am jeweiligen Ort der Uteruseröffnung gewonnen, auch hier falls immer möglich zusammen mit fetalem Choriongewebe.

Sämtliche einem Kaiserschnitt unterzogenen Kühe waren gemäss der vorliegenden Daten über den Zeitpunkt der künstlichen Besamung zwischen 269 und 282 Tagen trächtig. Bei einer ersten Gruppe wurde mittels einmaliger Prostaglandininjektion (Cloprostenol; 1mg pro Tier, i.m. oder s.c.) 27 Stunden vor der Sectio die Geburt eingeleitet. Tiere einer zweiten Gruppe wurden ohne Geburtseinleitung und in Abwesenheit sämtlicher Geburtsanzeichen schnittentbunden. An Dystokie leidende Tiere wurden in Gruppe drei zusammengefasst. Bei ihnen setzte die Geburt spontan ein, die Geburtsvorgänge kamen aber aus unterschiedlichen Gründen zum Erliegen, so dass die Feten per Kaiserschnitt entwickelt werden mussten.

Die Kaiserschnitte wurden unter Lokalanästhesie (Procaine; Iscocaine Lösung 2%, Selectavet, Weyarn, Deutschland) durchgeführt. Neben den 40 für die paravertebrale Anästhesie benötigten Millilitern Anästhetikum wurden zusätzlich 80 ml für die Infiltrationsanästhesie im Schnittbereich verwendet.

5.1.3 Tiere post partum

Diese Biopsieproben wurden ebenfalls an der Tierärztlichen Hochschule Hannover entnommen und zwar innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung einer Spontangeburt. Die Exzision der Uteruswandproben erfolgte per vaginam mittels einer Biopsiezange (Narco Pilling, Fort Washington, PA, USA). Jedes Tier wurde eine Woche nach der Probenentnahme gründlich allgemein und gynäkologisch untersucht und nötigenfalls therapiert.

5.2 Gruppeneinteilung

Aufgrund der Tatsache, dass zwar alle Proben exakt genau gleich gewonnen, nicht aber identisch verarbeitet wurden, mussten zwei Vergleichsgruppen gebildet werden. In Vergleichsgruppe A finden sich die in der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Paraffin eingebetteten Gewebeproben, während die Paraffinblöcke der Vergleichsgruppe B an der Vetsuisse-Fakultät in Zürich hergestellt wurden. Die weitere Unterteilung der Vergleichsgruppen erfolgte anhand des Trächtigkeitsstadiums sowie der Art der Probengewinnung (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Gruppeneinteilung

Vergleichs-Gruppe	Gruppen-Nummer	Anz. Tiere	Eigenschaften
A	A1	6	8. Monat der Trächtigkeit
A	A2	5	9. Monat der Trächtigkeit
A	A3	5	Kaiserschnitt, Tag 275 – 282, eingeleitet
A	A4	4	Kaiserschnitt, nach Dystokie
B	B1	6	Kaiserschnitt, Tag 269 – 271, eingeleitet
B	B2	6	Kaiserschnitt, nicht eingeleitet
B	B3	5	Post partum, Biopsieprobe

5.3 Progesteronbestimmungen

Den Tieren der Gruppen B1 und B2 wurde, mit einer Ausnahme, vor der Gewinnung der Gewebeproben aus der Vena jugularis peripheres Blut entnommen. Die Bestimmung der Konzentration des Progesterons im Plasma erfolgte durch den von Behrens et al. [8] beschriebenen Radioimmunoassay. Die kleinste nachweisbare Progesteronkonzentration betrug 0,01ng/ml. Der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 4,5%, der Interassay-Variationskoeffizient für Progesteron bei 9,7%.

5.4 Histologie

5.4.1 Probenaufarbeitung

Unmittelbar nach der Exzision wurden die Gewebestücke für 24 Stunden in 4%iges, neutral gepuffertes Formalin verbracht und anschliessend während 20 Stunden in Einbettkassetten (Jet Kassetten®, Leica) unter fliessendem Wasser gespült. Die darauf folgende Paraffineinbettung konnte in Zürich maschinell mittels des Gewebeinfiltrationsautomaten (Leica, TP1020®) gemäss dem Protokoll in Tabelle 5.3 und der Paraffinausgiesstation (Leica, EG1160®) vorgenommen werden, während in Hannover manuell gearbeitet wurde.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Rotationsmikrotom (Leica RM1160®) 4µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, welche anschliessend auf permanent positiv geladene Objektträger (SuperFrost Plus®, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen wurden. Die Trocknung fand während 30 Minuten bei 60 °C in einem Trockenschrank (Binder, APT.Line FD 115) statt.

Tabelle 5.3: Unterschiedliche Probenaufarbeitung in Zürich (links) und Hannover (rechts)

Dauer [h]	Reagens	Dauer [h]	Reagens
4	70% Alkohol	24	50% Alkohol
4	70% Alkohol	24	70% Alkohol
4	96% Alkohol	24	80% Alkohol
4	96% Alkohol	4 – 5	96% Alkohol
4	100% Alkohol	3 – 4	Essigsäure-n-Butylester
4	100% Alkohol	12	Paraplast, 60°C
4	Methylbenzoat	2	Paraplast, 60°C
4	Methylbenzoat	2	Paraplast, 60°C
4	Xylol		
4	Xylol		
4	Paraffin		
4	Paraffin		

5.4.2 Probenauswahl

Um aus den angefertigten Paraffinblöcken die qualitativ besten herauszufiltern, wurde an je einem Schnitt eine Hämalaun-Eosin-Färbung (Hämalaun nach Mayer) [12] durchgeführt und die Proben anschliessend mit dem Objektträger-Eindeckautomat (Medite, RCM 2000®) und Xylol-löslichem Schnelleindeckmittel (Pertex®, Medite) eingedeckt.

In den Versuch aufgenommen wurden nur Blöcke, die alle für die Untersuchung wichtigen Gewebsschichten enthielten (Oberflächenepithel, Stroma, Drüsenepithel, Myometrium) und deren Zellen gut erhalten waren. Blöcke mit sehr viel Blut innerhalb der verschiedenen Schichten wurden, wenn es die Probenauswahl zuliess, aussortiert.

5.5 Immunhistochemische Methoden

Die Nachweise der Hormonrezeptoren beruht in dieser Arbeit auf immunhistochemischen Prinzipien.

Immunhistochemie ist ein Sammelbegriff für verschiedene Methoden, die zur Sichtbarmachung von zell- und gewebespezifischen Antigenen verwendet werden, indem diese mit Hilfe von Antikörpern in situ markiert und visualisiert werden.

Man unterscheidet direkte von indirekten immunhistochemischen Methoden. In dieser Studie wurde nur mit der indirekten Methode gearbeitet, bei welcher mehrere biotinylierte sekundäre Antikörper an verschiedenen Epitopen des primären Antikörpers binden, was zu einer Signalverstärkung und damit zu einer deutlich höheren Sensitivität führt [13].

Die gewählte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) macht sich die enorme Affinität von Avidin zu Biotin zu nutze, welche bis eine Million mal stärker als bei einer gewöhnlichen Antigen-Antikörper-Bindung sein kann und somit quasi irreversibel ist. Das Glykoprotein Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin [64], welches sich seinerseits mit diversen Proteinen (z.B. sekundärer Antikörper) inklusive Enzymen (z.B. Meerrettichperoxidase) konjugieren lässt. Diese Eigenschaften können zur Bildung makromolekularer Komplexe, bestehend aus durch Avidin quervernetzter biotinylierter Peroxidase genutzt werden. Obwohl die dreidimensionale Struktur des Avidins noch nicht ganz verstanden ist, ist klar, dass mindestens eine Biotinbindungsstelle pro Komplex frei bleibt. Diese Bindungsstelle ist es, die an die biotinylierten sekundären Antikörper bindet und somit die für die Farb-reaktion wichtigen Enzyme in unmittelbare Nähe zu den Antigenen bringt.

Mittels dem Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) konnte die Lokalisation der Antigene sichtbar gemacht werden. Das auf dem zu färbenden Schnitt als Elektronendonator wirkende Chromogen aktiviert die reversibel blockierte Meerrettichperoxidase [13]. Diese setzt das DAB in ein braunes in Alkohol und in anderen organischen Lösungsmitteln unlösliches Farbprodukt um.

5.5.1 Progesteronrezeptoren

Der verwendete monoklonale Antikörper α PR6 aus der Maus wurde uns freundlicherweise von D. O. Toft (Department of Cell Biology, Mayo Medical School, Rochester, Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper wurde gegen die Aminosäuren 113-125 des aviären Progesteronrezeptors entwickelt [88], kreuzreagiert aber auch mit dem Progesteronrezeptor des Rindes [46]. Die genannte Aminosäuresequenz ist den beiden Isoformen A und B des Progesteronrezeptors gemeinsam [40].

Die Entparaffinierung und Rehydrierung wurde standardmässig gemäss Tabelle 9.1 durchgeführt. Anschliessend wurden die Proben im Mikrowellenofen in einem mit Citratpuffer gefüllten Gefäss bis zum Kochen aufgeheizt und dann bei konstanter Temperatur während drei Mal vier Minuten zur Demaskierung der Antigene weiter gekocht und schliesslich während 20 Minuten in frischem Citratpuffer abgekühlt. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren wurde die endogene Peroxidase in 3% H_2O_2 geblockt sowie elektrostatische Ladungen mit Normalserum vom Pferd [64] aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit (Mouse IgG) (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) und Serum-freiem Proteinblock (Dakocytomation, Zug, Schweiz) abgesättigt. Die Inkubation

mit dem in TBS verdünnten Primärantikörper fand während 60 Minuten in einer waagrecht ausgerichteten Feuchtkammer bei Raumtemperatur statt. Das VECTASTAIN Elite ABC Kit (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) mit einem im Pferd hergestellten sekundären, gegen die Maus gerichteten Antikörper wurde zur weiteren Immunolokalisation gemäss Anleitung des Herstellers eingesetzt, bevor die Reaktionen mit Hilfe des DAB Substrat-Kits für Peroxidase (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) visualisiert wurden. Als letzter Färbeschritt vor der aufsteigenden Alkoholreihe und dem Eindecken schloss sich eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach P. Mayer an. Sie vereinfachte die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen während der Auswertung wesentlich. Dem Protokoll in Tabelle 9.2 sind die jeweiligen Inkubationsdauern, Waschschritte und von den Herstellerangaben abweichende Konzentration zu entnehmen.

Um allfällige unspezifische Bindungen auszuschliessen, wurde bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher der Primärantikörper durch non-immune Maus-IgG (Firma Vector, Burlingame, CA, USA), einem speziellen, für Negativkontrollen entwickelten Antikörper, in identischer Verdünnung ersetzt wurde.

Als Positivkontrolle diente ein proöstrisches Tier. In diesem Zyklusstadium wiesen Boos et al. [17] Progesteronrezeptoren nach, weshalb anhand dieses Schnittes die Richtigkeit jedes Durchgangs überprüft werden konnte.

5.5.2 Östrogenrezeptoren

Der eingesetzte Östrogenrezeptor-Antikörper Ab-8 (Clone AER311) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) ist ein monoklonaler Antikörper, der durch Immunisierung von Mäusen mit dem Östrogenrezeptor- α -Protein aus Kälberuteri hergestellt wurde und folglich für Untersuchungen am Rind geeignet ist. Unter anderem fand dieser Antikörper bereits Verwendung in Studien am bovinen Plazentom [82].

Entparaffiniert und rehydriert wurde gemäss Tabelle 9.1. Der Antigenretrieval gestaltete sich insbesondere in Vergleichsgruppe B schwierig. Mit Citratpuffer konnte bei gleicher Vorgehensweise wie beim Progesteronrezeptornachweis nur in Vergleichsgruppe A ein deutliches Signal erreicht werden (Tabelle 9.4). Mit vorgeheiztem basischem TEC-Puffer und einer verlängerten Hitzebehandlung, diesmal im Wasserbad, bei Temperaturen knapp unter dem Siedepunkt (95-97°C) gelang es jedoch auch in Gruppe B die Epitope freizulegen (Tabelle 9.5). Die endogene Peroxidase wurde mit 2% H₂O₂ geblockt, unspezifische

Bindungen mit Pferde-Normalserum aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit (Mouse IgG) (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) sowie Serum-freiem Proteinblock (Dakocytomation, Zug, Schweiz) verhindert, bevor die Schnitte während 20 Stunden im Kühlschrank bei 4°C [82] mit dem primären, in TBS verdünnten Antikörper inkubiert wurden. Detektiert wurde der Primärantikörper mit dem gegen die Maus gerichteten, im Pferd hergestellten, sekundären Antikörper aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) und anschliessend die Reaktion mit dem Substrat-Kit für Peroxidase (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) sichtbar gemacht. Auch hier erfolgte vor der aufsteigenden Alkoholreihe und dem Eindecken eine Gegenfärbung der Zellkerne.

Auch beim Östrogenrezeptor-Nachweis wurde bei jedem Färbedurchgang eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Für die Positiv-Kontrolle wurde Uteruswand einer proöstrischen Kuh [17] mit dem Östrogenrezeptor-Antikörper Ab-8 (Clone AER311) angefärbt (Abbildung 6.10), während für die Negativ-Kontrolle der Primärantikörper durch non-immune Maus-IgG (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) in gleicher Konzentration ausgetauscht wurde.

5.5.3 Glukokortikoidrezeptoren

Der im Kaninchen hergestellte polyklonale Antikörper gegen humane Glukokortikoid-Rezeptoren (GR α und GR β) wurde an Mensch, Maus und Ratte getestet [25]. Boos et al. [16, 54] verwendeten ihn bereits erfolgreich für ihre Arbeiten am Plazentom des Rindes während der Trächtigkeit und zum Zeitpunkt der Geburt.

Mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wurde, wie im Protokoll der Tabelle 9.1 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Die Antigendemaskierung konnte für Vergleichsgruppe A und B einheitlich gestaltet werden. Eine Behandlung während 15 Minuten im auf 95-97 °C vorgeheizten Tris-EDTA-Puffer (Wasserbad) und eine anschliessende Abkühlung in heissem Puffer bei Raumtemperatur erwies sich als am günstigsten. Die endogen vorkommende Peroxidase wurde mit 2% H₂O₂ in Aqua dest. blockiert und das endogene Biotin bzw. die biotinbindenden Proteine mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) geblockt. Anschliessend folgte die übliche Inkubation mit Ziegen-Normalserum aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit (Rabbit IgG) (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) und dem Serum-freien Proteinblock (Dakocytomation, Zug, Schweiz). Der 300fach in TBS verdünnte Primärantikörper wurde während 20 Stunden bei 4°C auf den Schnitten belassen bevor er durch den sekundären

Ziege-anti-Maus-Antikörper und den ABC-Komplex aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) detektiert wurde. Die Peroxidase der ABC-Komplexe wandelte das Chromogen aus dem Substrat-Kit für Peroxidase (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) schliesslich in einen braunen Farbstoff um. Vor dem Eindecken wurden die Zellkerne in Hämalaun gegengefärbt. Eine Auflistung aller Arbeitsschritte ist im Protokoll der Tabelle 9.5 zu finden.

Als Positivkontrolle diente eine Plazentaprobe eines unter Geburt stehenden Rindes. Für die Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper durch non-immune Rabbit-IgG (Firma Vector, Burlingame, CA, USA) in identischer Konzentration ersetzt.

5.6 Auswertung

Alle immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop (Leica DMLB®) bei 400facher Vergrösserung beurteilt und ausgewertet. Bei der Beurteilung wurde vor allem auf eine homogene Anfärbung über den ganzen Schnitt geachtet. Für die Auswertung wurden im Oberflächenepithel, im oberflächlichen und tiefen Stroma, in den Drüsen und im Myometrium je 500 Zellen aus verschiedenen Gesichtsfeldern angeschaut und je nach Ausprägung der Braunfärbung in 4 Kategorien eingeteilt: Negativ, schwach, mittelmässig und stark angefärbte Zellkerne. Aus der ermittelten Anzahl Kerne jeder Kategorie und der Gesamtzahl aller ausgezählten Zellkerne pro Schicht konnte der prozentuale Anteil jeder Kategorie ermittelt werden. Die Prozentzahl der negativen Zellkerne wurde mit 0 multipliziert, die schwach angefärbten Kerne mit 1, die mittelmässig angefärbten Zellkerne mit 4 und schliesslich die stark angefärbten mit 9. Der immunreaktive Score errechnet sich durch Addition der einzelnen Produkte.

Tabelle 5.4: Immunreaktiver Score

Durchschnittliche Anfärbung	IRS
Negativ	0
Negativ bis schwach	0 – 100
Schwach	100
Schwach bis mittelmässig	100 – 400
Mittelmässig	400
Mittelmässig bis stark	400 – 900
Stark	900

Bei einem immunreaktiven Score von Null sind sämtlich Kerne negativ angefärbt, es sind also keine Rezeptoren vorhanden. Liegt der immunreaktive Score bei 900 sind alle Kerne

kräftig dunkelbraun eingefärbt. Die Abstufungen dazwischen sind der Tabelle 5.4 zu entnehmen.

5.7 Statistik

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm StatView 5.1 (SAS Institute Inc, NC, USA). Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Test als post-hoc Analyse sowie eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung wurde durchgeführt. Es wurde immer mit Mittelwerten und Standardfehlern gearbeitet. Testergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ sind in der Auswertung als statistisch signifikant betrachtet worden.

6 Resultate

6.1 Progesteronbestimmung

Die mittels Radioimmunoassay bestimmten Plasmaprogesteronspiegel der Tiere aus den Gruppen B1 und B2 sowie deren Mittelwerte sind in Tabelle 9.9 aufgeführt. Der Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen zeigt im ungepaarten t-Test signifikant ($p=0.03$) tiefere Werte für die Gruppe der Tiere mit eingeleitetem Kaiserschnitt (Gruppe B1).

6.2 Immunhistochemische Befunde

Der immunhistochemische Nachweis der Steroidhormonrezeptoren in der interkarunkulären Uteruswand des Rindes und die anschliessende semiquantitative Auswertung im Mikroskop führte zu den nachfolgend aufgeführten Resultaten.

6.2.1 Progesteronrezeptor-Nachweis

Progesteronrezeptoren konnten in den Vergleichsgruppen A und B, ausser im Oberflächenepithel (Abbildung 6.3), immunhistochemisch in den Kernen sämtlicher Zelltypen der untersuchten Gewebeschichten (oberflächliches und tiefes Stroma, Drüsenepithel, Myometrium) nachgewiesen werden. Abbildung 6.2 zeigt die untersuchten Gewebeschichten bei schwacher Vergrösserung.

In Tabelle 6.1 sind die Mittelwerte des Immunreaktiven Scores (IRS) aller Gruppen sowie deren Standardfehler aufgelistet. Die statistische Auswertung (Abbildung 6.1) ergab innerhalb der beiden Vergleichsgruppen keine signifikante Zu- oder Abnahme des IRS in Abhängigkeit von der Trächtigkeitsdauer bzw. zwischen Tieren mit natürlicher und künstlicher Geburtsinduktion. Auch der IRS der Gruppe von Tieren, denen Biopsieproben post partum entnommen wurden, unterschied sich nicht signifikant von jenem der anderen Gruppen.

In den Drüsenepithelien wurden die niedrigsten IRS ermittelt (Abbildung 6.4). Mit Ausnahme einiger Tiere in Gruppe A3 bzw. B3 blieb bei allen Proben der grösste Teil der Zell-

kerne in dieser Schicht unangefärbt und die vereinzelt positiven Kerne zeigten lediglich eine schwache Färbung. Deutlich höhere IRS konnten dagegen im Stroma und im Myometrium (Abbildung 6.5) beobachtet werden. Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede bezüglich dem Progesteronrezeptor-Vorkommen in den einzelnen Gewebeschichten (Tabelle 9.6). Ausser der oberflächlichen und der tiefen Stromaschicht, deren IRS sich nur innerhalb der Gruppe A2 und B2 signifikant unterschied, konnten in praktisch allen weiteren Gewebeschichtvergleichen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine Ausnahme stellt lediglich der Vergleich des Drüsenepithels mit dem tiefen Stroma in Gruppe B3 dar, welcher nicht signifikant ausfiel.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Vorkommen der Progesteronrezeptoren nur abhängig vom Zell- bzw. Gewebetyp, nicht aber vom Zeitpunkt der Gewebeentnahme ist.

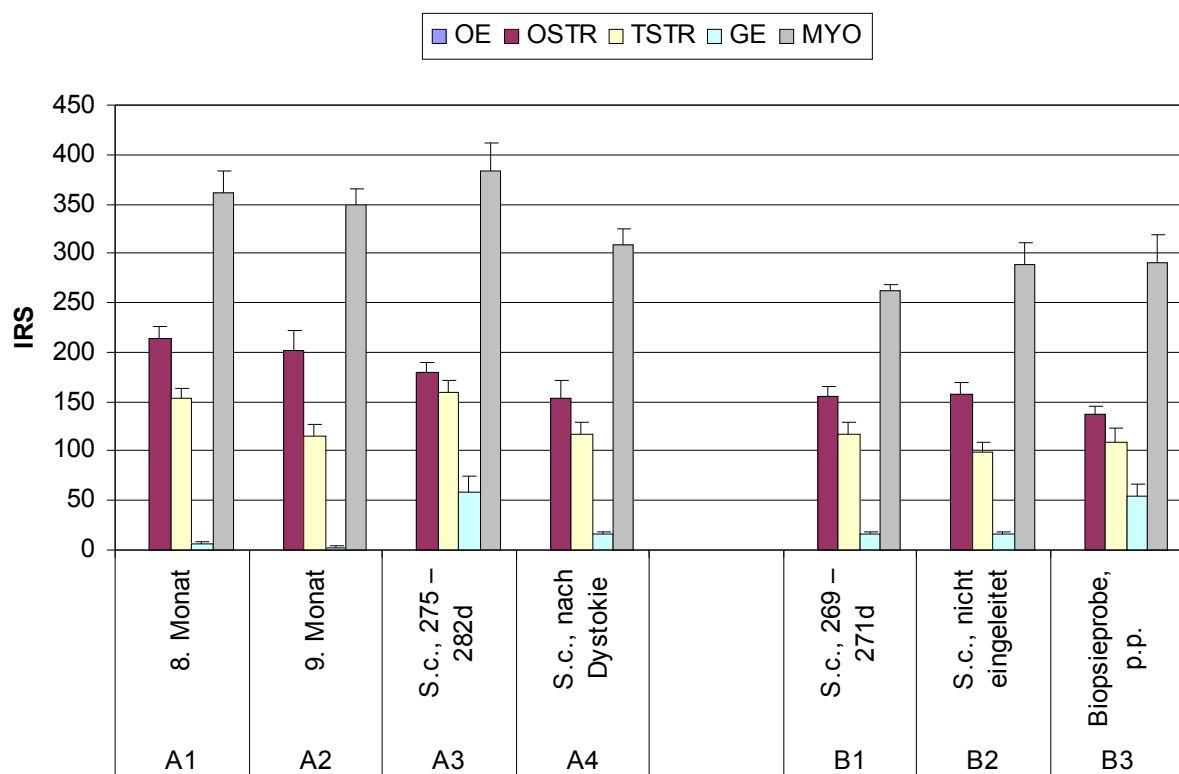


Abbildung 6.1: Progesteronrezeptor-Nachweis: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in allen Gewebeschichten und Gruppen ermittelten IRS. OE = Oberflächenepithel (in allen Gruppen negativ), OSTR = oberflächliches Stroma, TSTR = tiefes Stroma, GE = Drüsenepithel, MYO = Myometrium.

Tabelle 6.1: Resultate des Progesteronrezeptor-Nachweises

Gewebeschicht	Gruppe	Mittelwert Immun-reaktiver Score	Standardfehler
Oberflächliches Stroma	A1	213.433	13.291
	A2	201.320	21.290
	A3	178.920	11.661
	A4	153.203	17.475
	B1	155.800	9.268
	B2	157.485	11.167
	B3	137.840	7.723
Tiefes Stroma	A1	153.533	10.771
	A2	114.680	12.663
	A3	159.840	11.555
	A4	117.950	10.394
	B1	117.533	11.687
	B2	99.333	10.269
	B3	109.114	14.571
Drüsenepithel	A1	5.267	3.555
	A2	2.600	1.464
	A3	57.840	16.689
	A4	15.700	2.450
	B1	15.333	2.968
	B2	15.633	2.724
	B3	53.702	13.631
Myometrium	A1	361.967	20.706
	A2	349.920	16.000
	A3	382.760	28.025
	A4	308.950	15.075
	B1	261.333	6.513
	B2	288.800	22.760
	B3	291.200	28.400

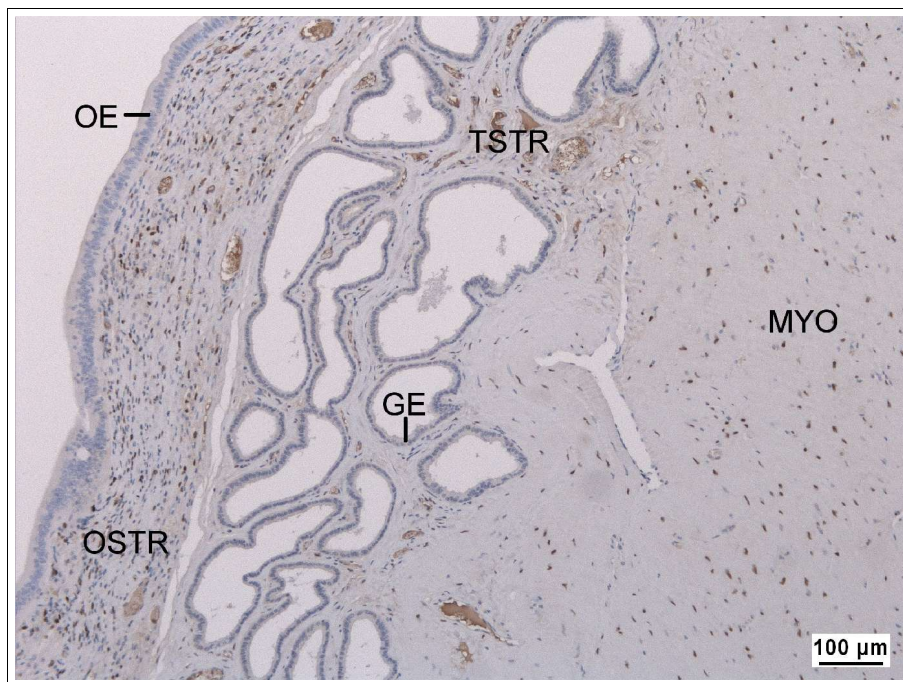


Abbildung 6.2: Progesteronrezeptor-Nachweis: Übersicht über die verschiedenen Gewebeschichten eines Tieres aus Gruppe A2. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma, TSTR = tiefes Stroma, GE = Drüsenepithel, MYO = Myometrium.

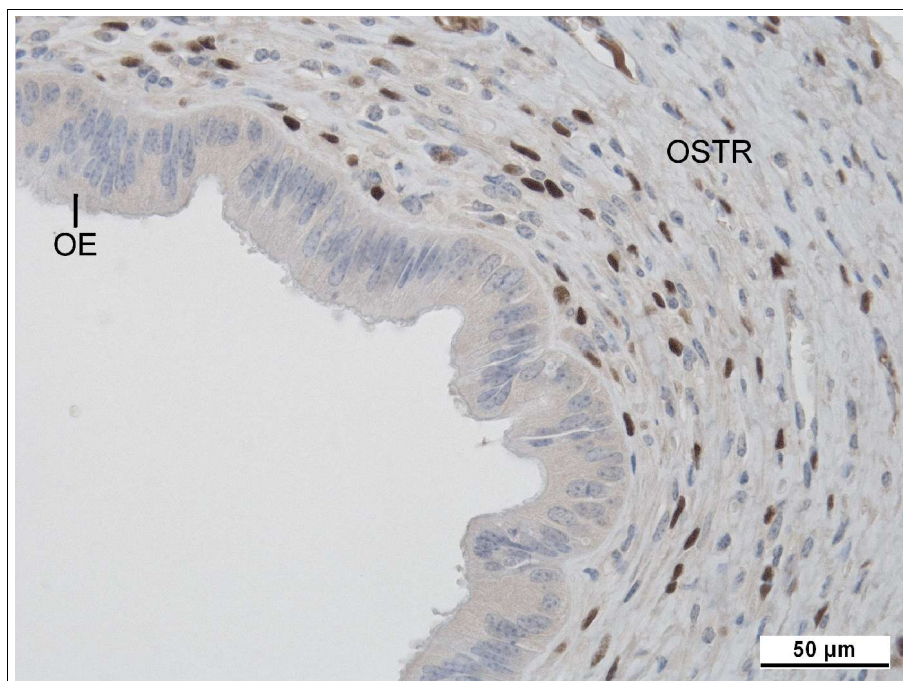


Abbildung 6.3: Progesteronrezeptor-Nachweis: Unangefärbtes Oberflächenepithel, spezifische nukleäre Färbung im oberflächlichen Stroma eines Tieres aus Gruppe A1. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma.

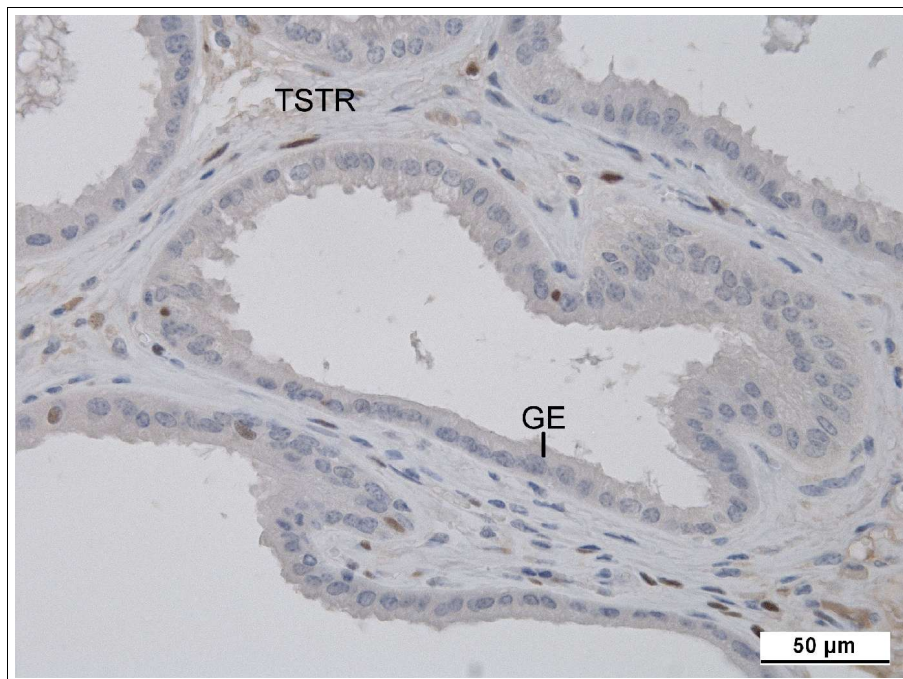


Abbildung 6.4: Progesteronrezeptor-Nachweis: Vereinzelt positiv angefärbte Zellkerne im Drüsenepithel, spezifische nukleäre Färbung im tiefen Stroma eines Tieres aus Gruppe A1. GE = Drüsenepithel, TSTR = tiefes Stroma.

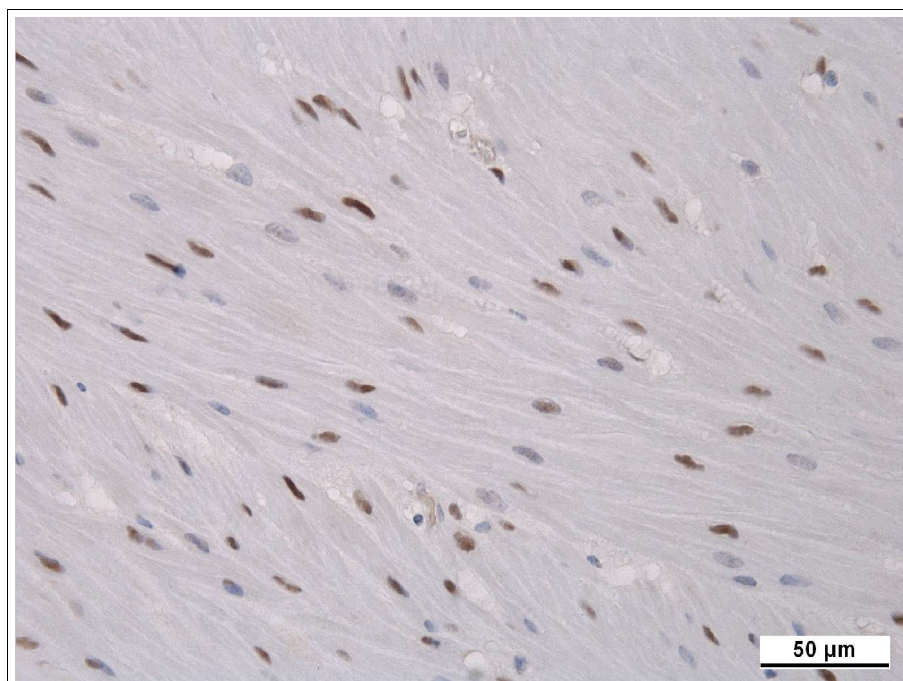


Abbildung 6.5: Progesteronrezeptor-Nachweis: Ausschnitt aus dem Myometrium eines Tieres aus Gruppe A1 mit einer Vielzahl an mittelmässig und stark angefärbten Zellkernen.

6.2.2 Östrogenrezeptor-Nachweis

Im Gegensatz zu den Progesteronrezeptoren konnten Östrogenrezeptoren in allen fünf der immunhistochemisch untersuchten Gewebeschichten nachgewiesen werden. Bezüglich der intrazellulären Lokalisation unterschieden sich die Rezeptoren für Progesteron und Östrogene jedoch nicht; beide waren im Kern lokalisiert.

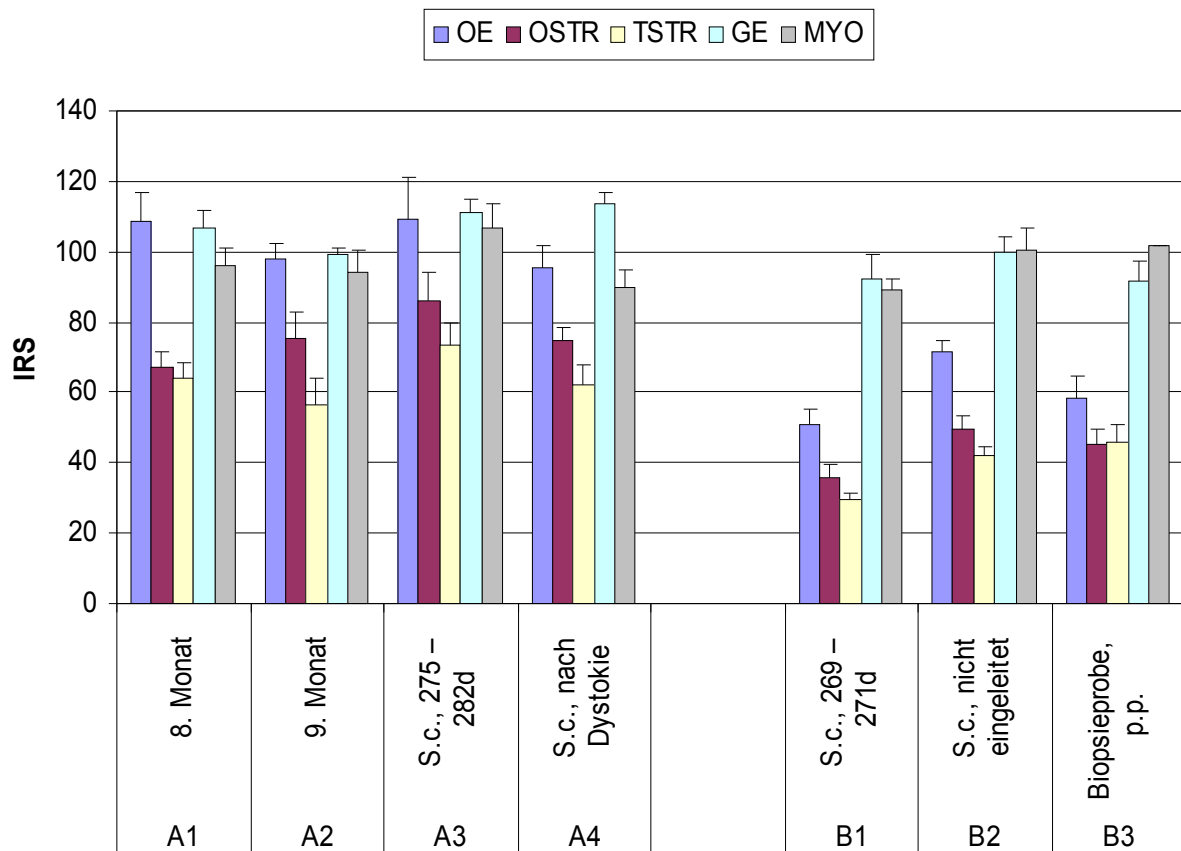


Abbildung 6.6: Östrogenrezeptor-Nachweis: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in allen Gewebeschichten und Gruppen ermittelten IRS. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma, TSTR = tiefes Stroma, GE = Drüsenepithel, MYO = Myometrium.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung unter dem Mikroskop sind in der Tabelle 6.2 in Form von Mittelwerten des Immunreaktiven Scores (IRS) inklusive den entsprechenden Standardfehlern aufgelistet. Auch für die Östrogenrezeptoren ergab die statistische Aufbereitung der Resultate innerhalb der Vergleichsgruppen A und B keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Trächtigkeitsdauer bzw. auf die Art der Geburtsinduktion. Der IRS der Tiere, denen post partum eine Biopsieprobe entnommen wurde, vermochte sich ebenfalls nicht signifikant von demjenigen der anderen Gruppen zu

unterscheiden (Abbildung 6.6).

Die höchsten IRS konnten im Drüsenepithel (Abbildung 6.8), im Myometrium (Abbildung 6.9) sowie im Oberflächenepithel (Abbildung 6.7) ermittelt werden. Die beiden Stromaschichten folgten mit tieferen Werten. In keiner der untersuchten Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der oberflächlichen und der tiefen Schicht des Stromas festgestellt werden (Tabelle 9.7). In Vergleichsgruppe B fiel bei der Gegenüberstellung der einzelnen Gewebeschichten auf, dass mit einer einzigen Ausnahme sämtliche Signifikanzen aus dem Vergleich des Myometriums bzw. des Drüsenepithels mit den restlichen drei Schichten herrührten. In Vergleichsgruppe A präsentierte sich der Schichtenvergleich uneinheitlicher, einzig der IRS des Drüsenepithels unterschied sich von jenem des tiefen Stroma in allen vier Gruppen signifikant.

Das Vorkommen und die Verteilung der Östrogenrezeptoren in der Uteruswand ist demzufolge weder vom Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch konstant vom Zelltyp abhängig.

Tabelle 6.2: Resultate des Östrogenrezeptor-Nachweises

Gewebeschicht	Gruppe	Mittelwert Immun-reaktiver Score	Standardfehler
Oberflächenepithel	A1	108.333	8.611
	A2	98.160	4.344
	A3	109.120	12.295
	A4	95.600	6.044
	B1	50.667	4.406
	B2	71.667	3.070
	B3	58.240	6.709
Oberflächliches Stroma	A1	67.300	4.391
	A2	75.440	7.385
	A3	86.040	7.967
	A4	74.550	3.925
	B1	35.967	3.276
	B2	49.500	4.141
	B3	45.040	4.775
Tiefes Stroma	A1	64.100	4.476
	A2	56.680	7.528
	A3	73.680	6.094
	A4	62.400	5.423
	B1	29.400	1.801
	B2	41.967	2.401
	B3	45.588	5.332
Drüsenepithel	A1	106.700	5.174
	A2	99.040	2.334
	A3	111.360	3.340
	A4	113.500	2.978
	B1	92.433	6.829
	B2	100.000	4.180
	B3	91.502	5.584
Myometrium	A1	96.000	5.363
	A2	94.320	5.912
	A3	107.000	6.905
	A4	89.900	5.063
	B1	89.000	3.286
	B2	100.400	6.486
	B3	101.400	0.000

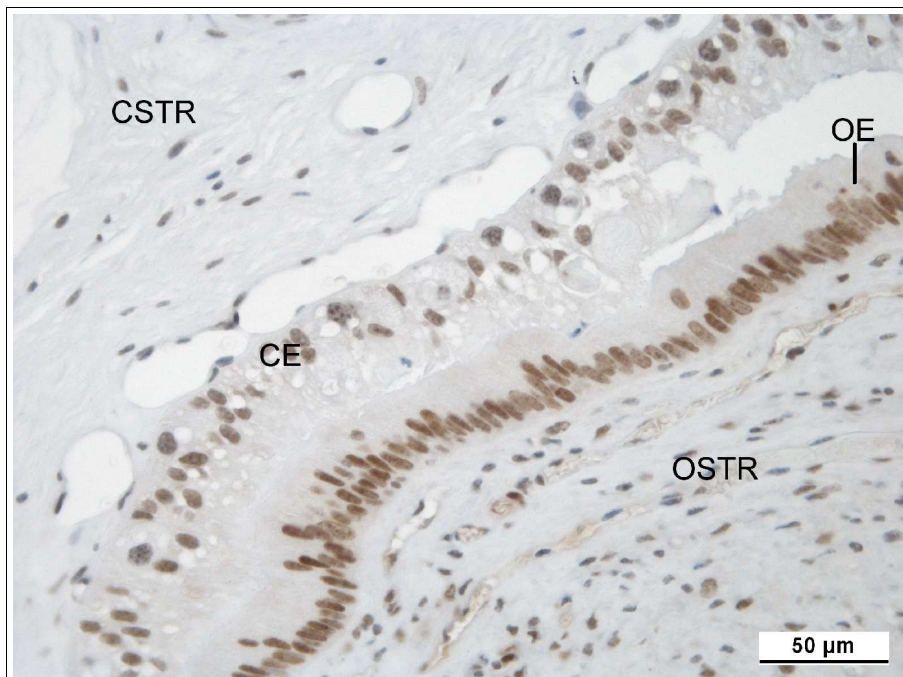


Abbildung 6.7: Östrogenrezeptor-Nachweis: Deutlich angefärbtes Oberflächenepithel eines Tieres aus Gruppe A1 im direkten Kontakt mit dem foetalen Chorionepithel. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma, CE = Chorionepithel, CSTR = Chorionstroma.

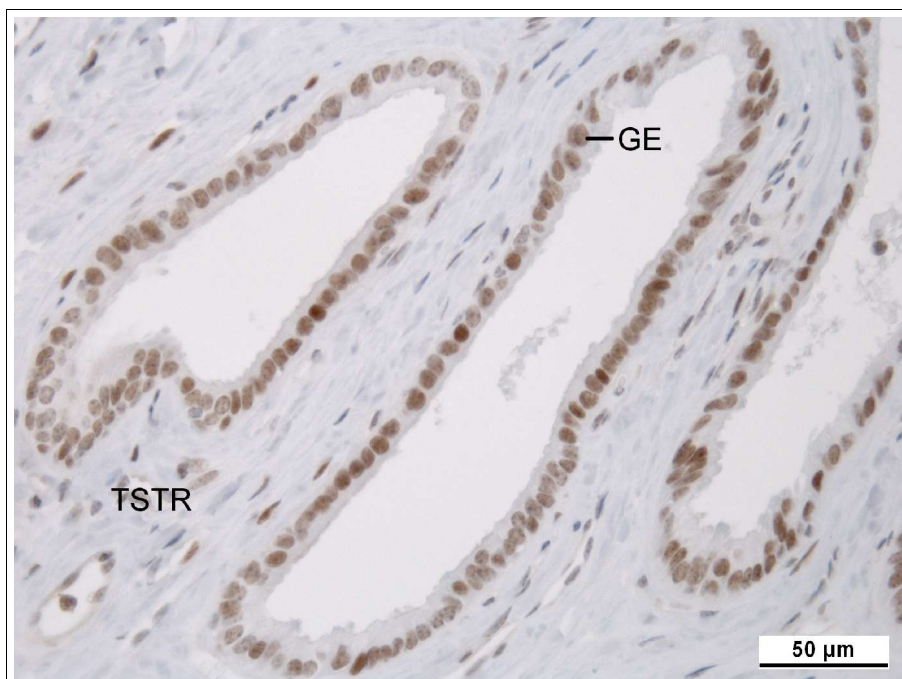


Abbildung 6.8: Östrogenrezeptor-Nachweis: Zellkerne im Drüsenepithel sind grösstenteils schwach positiv angefärbt; verglichen mit dem Drüsenepithel signifikant niedriger IRS im tiefen Stroma eines Tieres aus Gruppe B2. TSTR = tiefes Stroma, GE = Drüsenepithel.

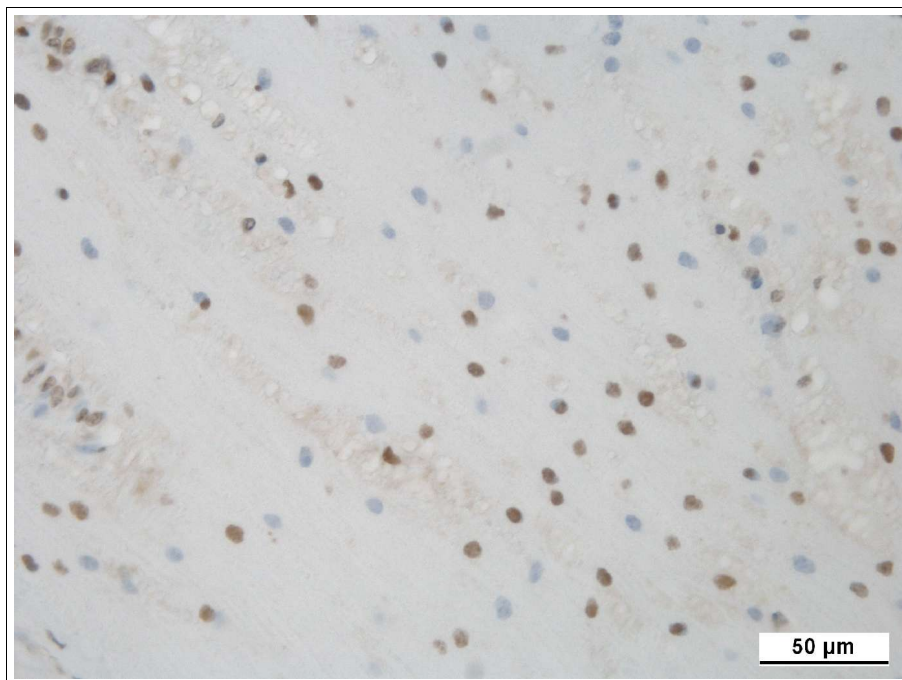


Abbildung 6.9: Östrogenrezeptor-Nachweis: Ausschnitt aus dem Myometrium eines Tieres aus Gruppe A1. Ungefähr die Hälfte der Zellkerne färbt sich schwach positiv an.

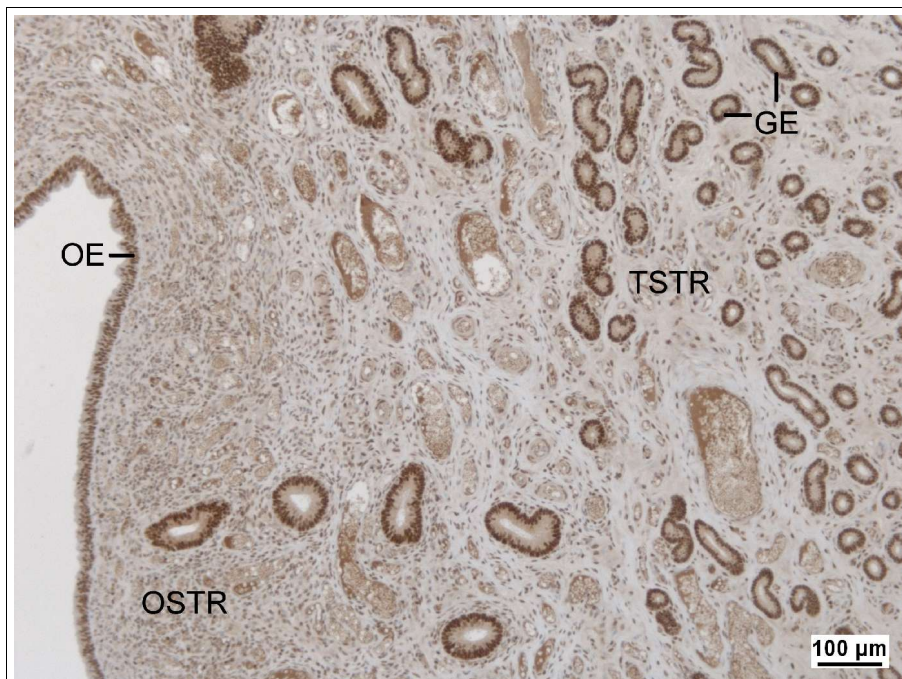


Abbildung 6.10: Östrogenrezeptor-Nachweis: Übersichtspräparat einer Positivkontrolle, durchgeführt an der interplazentomären Uteruswand eines proöstrischen Rindes. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma, TSTR = tiefes Stroma, GE = Drüsenepithel

6.2.3 Glukokortikoidrezeptor-Nachweis

Glukokortikoidrezeptoren konnten mittels Immunhistochemischer Methodik, analog zu den Östrogenrezeptoren, in den Zellkernen aller fünf untersuchten Gewebeschichten nachgewiesen werden.

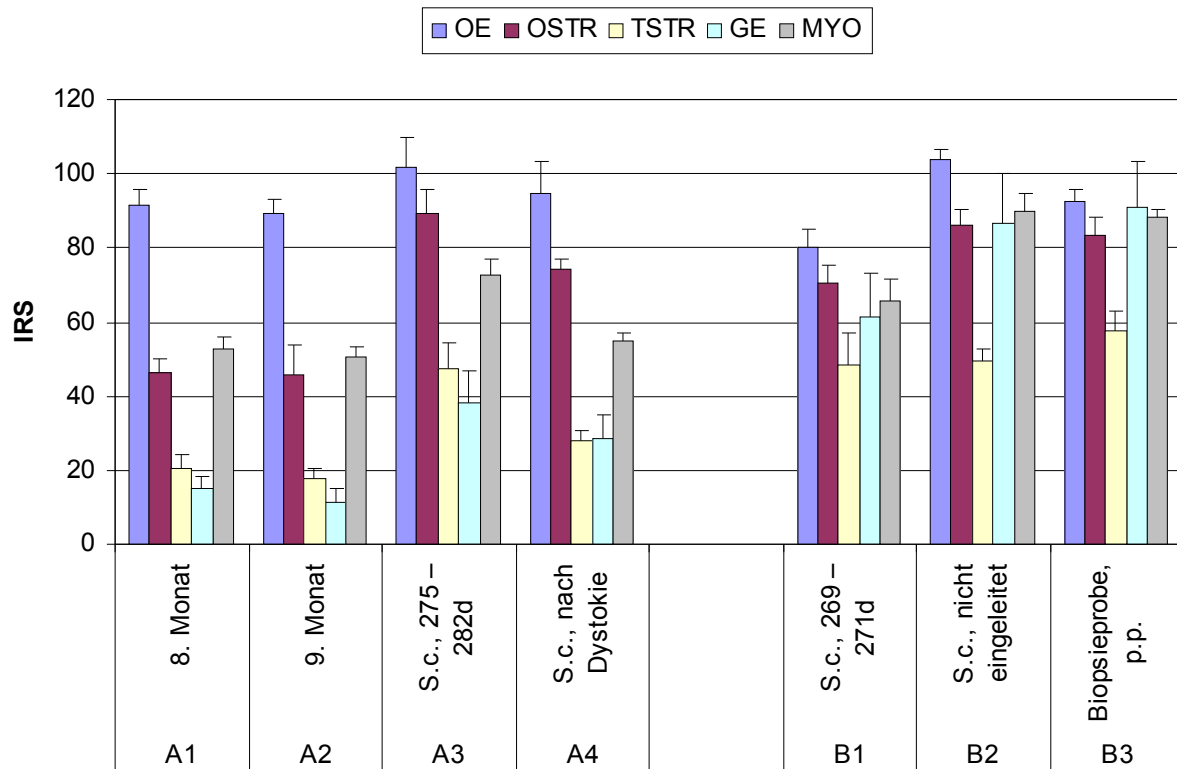


Abbildung 6.11: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in allen Gewebeschichten und Gruppen ermittelten IRS. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma, TSTR = tiefes Stroma, GE = Drüsenepithel, MYO = Myometrium.

Der Tabelle 6.3 sind die Ergebnisse des Glukokortikoidrezeptor-Nachweises zu entnehmen. Die statistische Analyse der Daten ergab innerhalb der Vergleichsgruppe B keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes der Probenentnahme (Abbildung 6.11). In Vergleichsgruppe A hingegen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Das oberflächliche Stroma von im achten bzw. neunten Monat trächtigen Kühen (Abbildung 6.14) wies im Vergleich mit den Tieren, denen die Gewebeproben nach einem eingeleiteten Kaiserschnitt entnommen wurden (Abbildung 6.15), einen signifikant tieferen IRS auf (Abbildung 6.12). Ebenso verhielt es sich mit dem IRS des tiefen Stromas von neun Monate trächtigen Kühen (Abbildung 6.16) im Vergleich mit jenem der Tiere mit eingeleitetem Kaiserschnitt (Abbildung 6.17, Abbildung 6.13). Weitere

6 Resultate

signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probenentnahme konnten jedoch nicht ermittelt werden.

In beiden Vergleichsgruppen stellt das Oberflächenepithel jeweils die am intensivsten angefärbte Gewebeschicht dar. In der Vergleichsgruppe A fiel der Vergleich zwischen dem Oberflächenepithel und den anderen Schichten, mit Ausnahme des oberflächlichen Stromas, immer signifikant aus (Tabelle 9.8). Auch der IRS des Drüsenepithels unterschied sich in den Gruppen A1 - A4 ausnahmslos signifikant vom IRS des oberflächlichen Stromas. Zu allen anderen Gewebeschichtenvergleichen aus Vergleichsgruppe A, wie auch zu jenen aus Vergleichsgruppe B, konnte keine allgemeingültige Aussage gemacht werden, da die Werte nicht konstant signifikant voneinander abwichen.

Die Auswertung der Resultate zeigt, dass das Vorkommen der Glukokortikoidrezeptoren im oberflächlichen bzw. tiefen Stroma trächtiger Tiere signifikant tiefer ist als bei Tieren mit eingeleitetem Kaiserschnitt. Der Vergleich der einzelnen Gewebeschichten innerhalb der Uteruswand zeigt hingegen nur zwischen einzelnen Schichten durchgehend signifikante Unterschiede.

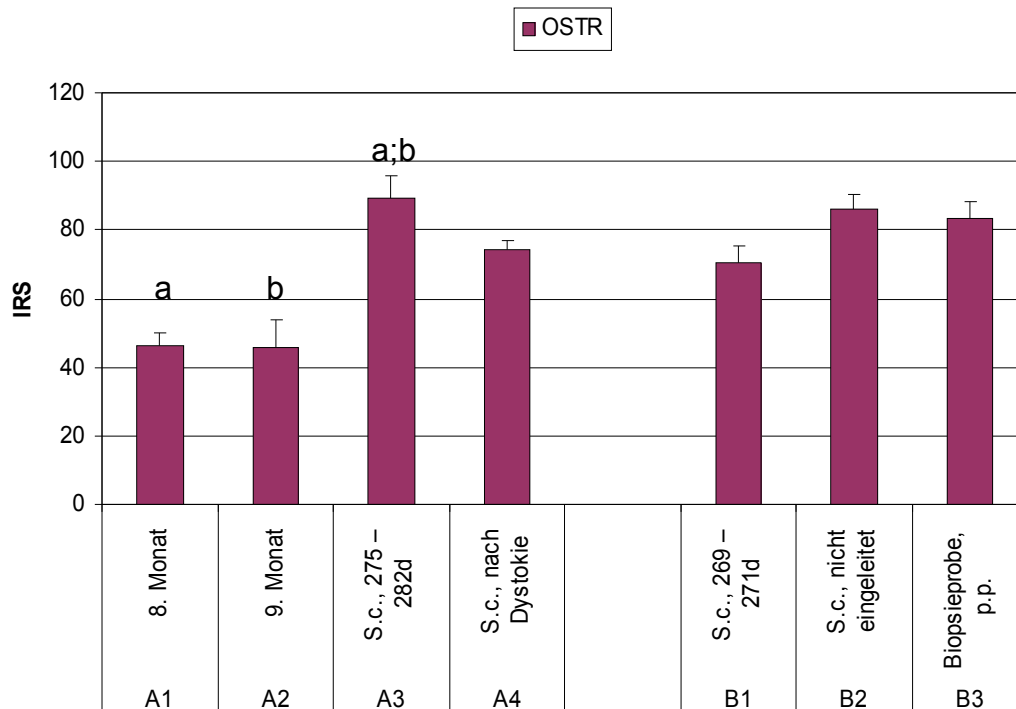


Abbildung 6.12: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis im oberflächlichen Stroma: Säulen mit dem identischen Index unterscheiden sich signifikant. OSTR = oberflächliches Stroma.

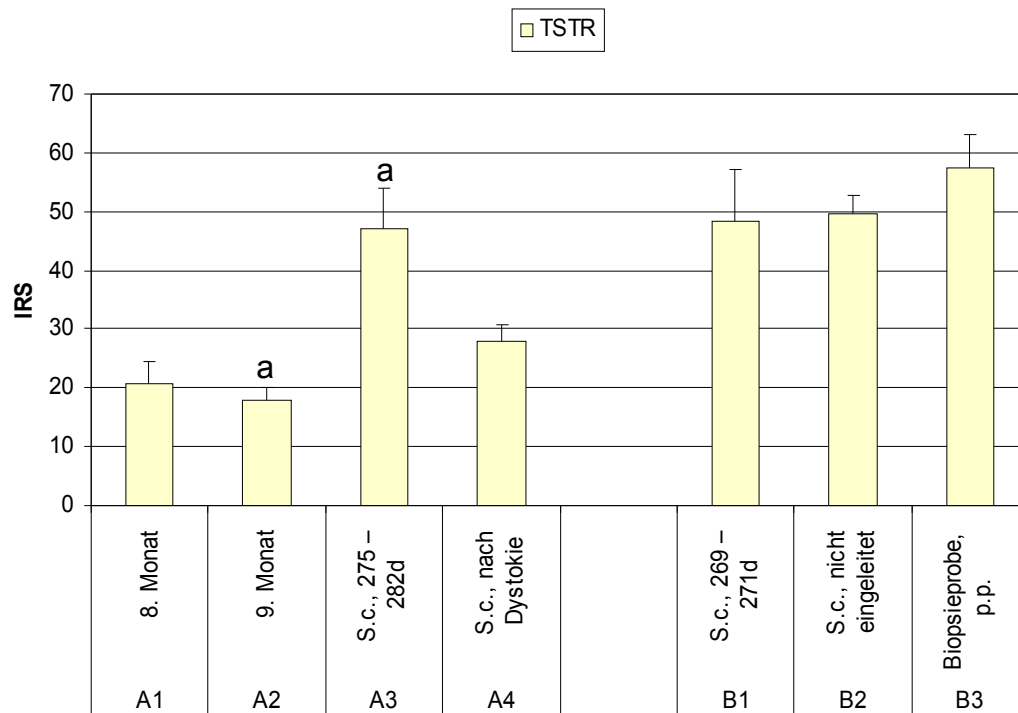


Abbildung 6.13: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis im tiefen Stroma: Säulen mit dem identischen Index unterscheiden sich signifikant. TSTR = tiefes Stroma

Tabelle 6.3: Resultate des Glukokortikoidrezeptor-Nachweises

Gewebeschicht	Gruppe	Mittelwert Immun-reaktiver Score	Standardfehler
Oberflächenepithel	A1	91.500	4.131
	A2	89.200	3.776
	A3	101.920	7.713
	A4	94.800	8.502
	B1	80.267	4.540
	B2	103.733	2.930
	B3	92.406	3.536
Oberflächliches Stroma	A1	46.267	3.524
	A2	45.680	8.015
	A3	89.120	6.881
	A4	74.350	2.526
	B1	70.367	5.026
	B2	86.067	4.148
	B3	83.360	4.983
Tiefes Stroma	A1	20.633	3.728
	A2	17.880	2.302
	A3	47.120	7.007
	A4	28.000	2.830
	B1	48.267	8.786
	B2	49.500	3.232
	B3	57.494	5.722
Drüsenepithel	A1	15.200	3.160
	A2	11.440	3.855
	A3	38.000	8.715
	A4	28.550	6.611
	B1	61.500	11.589
	B2	86.633	13.204
	B3	91.066	12.068
Myometrium	A1	52.833	3.216
	A2	50.560	2.598
	A3	72.760	4.250
	A4	55.150	1.981
	B1	65.667	5.686
	B2	89.800	4.773
	B3	88.000	2.400

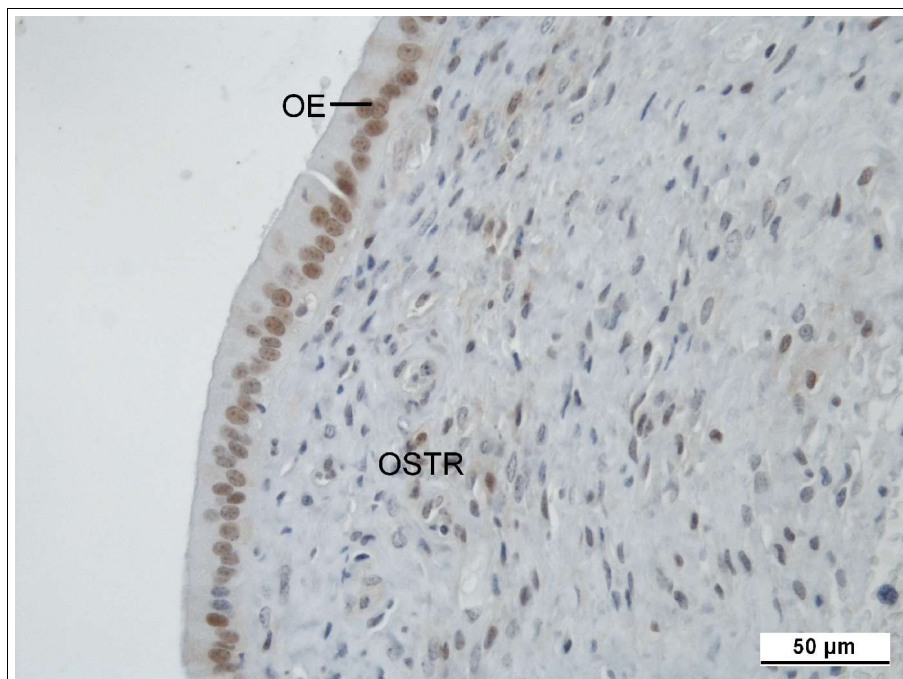


Abbildung 6.14: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis: Oberflächenepithel und oberflächliches Stroma eines Tieres aus Gruppe A2. Oberflächliches Stroma weist eine signifikant niedrigere Immunreaktion als in Gruppe A3 (Abbildung 6.15) auf. OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma.

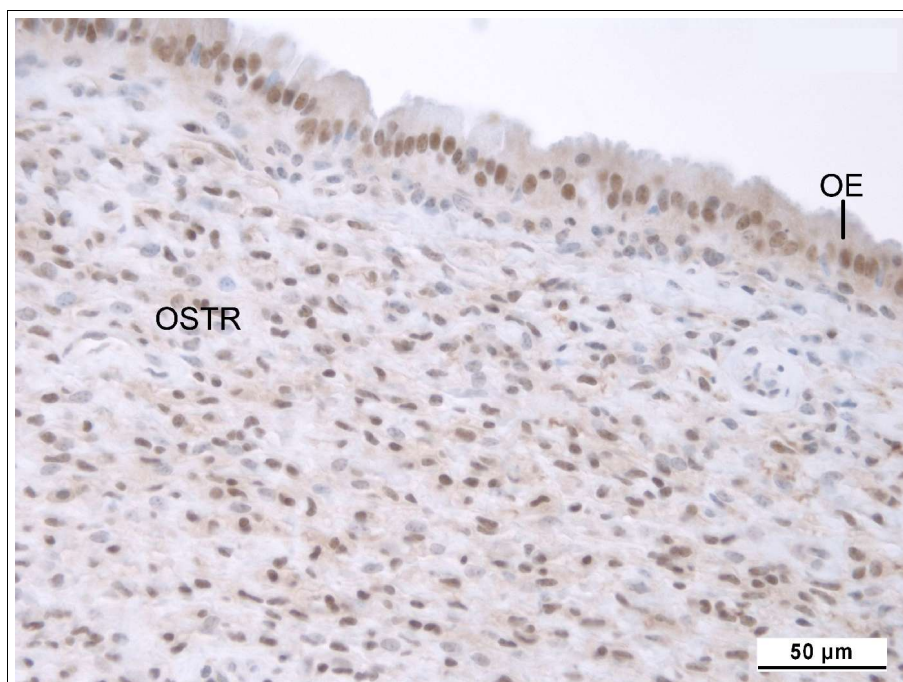


Abbildung 6.15: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis: Oberflächenepithel und oberflächliches Stroma eines Tieres aus Gruppe A3. Oberflächliches Stroma mit signifikant intensiverer Immunreaktion als in Gruppe A2 (Abbildung 6.14). OE = Oberflächenepithel, OSTR = oberflächliches Stroma.

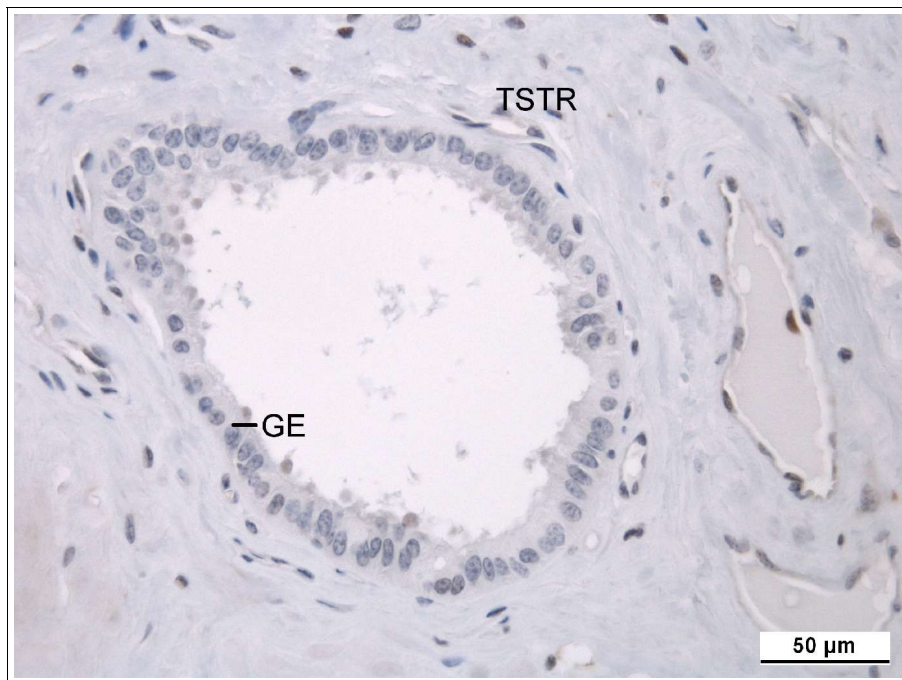


Abbildung 6.16: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis: Drüsenepithel und tiefes Stroma eines Tieres aus Gruppe A2. Die Immunreaktion des tiefen Stromas ist signifikant schwächer als in Gruppe A3 (Abbildung 6.17). GE = Drüsenepithel, TSTR = tiefes Stroma.

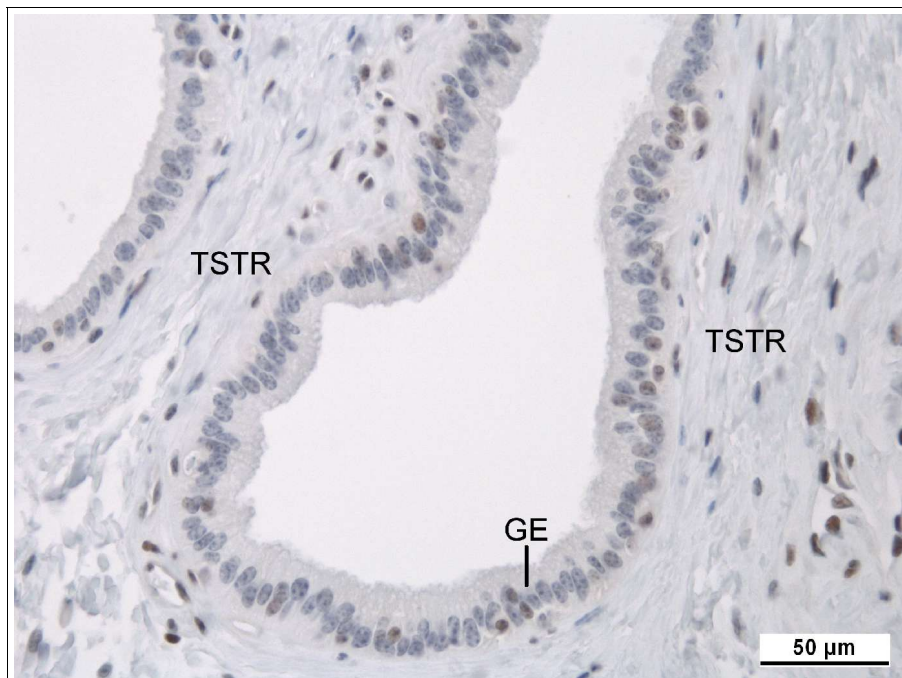


Abbildung 6.17: Glukokortikoidrezeptor-Nachweis: Drüsenepithel und tiefes Stroma eines Tieres aus Gruppe A3. Signifikant stärkere Immunreaktion im tiefen Stroma als in Gruppe A2 (Abbildung 6.16). GE = Drüsenepithel, TSTR = tiefes Stroma.

7 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mittels immunhistochemischer Methodik Informationen über das Vorkommen und die Verteilung der Rezeptoren für Progesteron, Östrogene und Glukokortikoide in der interplazentomären Uteruswand des Rindes vor, während und kurz nach der Geburt zu gewinnen. Unsere Untersuchung ist als eine Fortsetzung der Arbeit von Kohtes [54] und Boos et al. [15], die bisher als einzige mit der gleichen Fragestellung die neun Trächtigkeitsmonate bearbeitet haben, zu verstehen und soll Aufschluss darüber geben, ob die interkarunkuläre Uteruswand in gleicher oder ähnlicher Weise auf die der Geburt vorausgehenden hormonellen Veränderungen reagiert wie die Plazenta.

7.1 Probenmaterial und Auswertung

Für das Erreichen aussagekräftiger Resultate sind einheitlich entnommene und verarbeitete Gewebeproben von gesunden Tieren eine wichtige Voraussetzung. Da uterine Gewebeproben nicht vom selben tragenden Tier mehrmals und zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen werden konnten, mussten die Proben von mehreren Schlacht- bzw. Versuchstieren in den entsprechenden Untersuchungsstadien gesammelt werden. Dies bedeutet, dass innerhalb der einzelnen Probandengruppen individuelle Schwankungen auftreten können und es ebenfalls nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass bei den Schlachttieren ein Proband mit veränderter Steroidhormonrezeptormenge als Folge einer nicht bekannten hormonellen Vorbehandlung in die Untersuchung einbezogen wurde.

Weiter gilt es den Stress, welchem die Tiere auf dem Transport, vor der Tötung bzw. während der studentischen Übungen ausgesetzt waren zu berücksichtigen. In mehreren Untersuchungen konnte ein transportbedingter Anstieg des Cortisolspiegels [33] bzw. des Cortisol- und Progesteronspiegels [109] im Blut nachgewiesen werden. Es ist folglich nicht auszuschliessen, dass diese Hormonanstiege den Steroidhormonrezeptorgehalt im Gewebe zu beeinflussen vermochten. Auch das Resultat der Probandengruppe, die vor dem Kaiserschnitt bewusst nicht eingeleitet wurde (Gruppe B2), könnte durch den stressindu-

zierten Cortisolanstieg im Blut beeinträchtigt worden sein.

Bei den Tieren, deren Geburt 27 Stunden vor dem Kaiserschnitt mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ eingeleitet wurde, besteht die Möglichkeit, dass die Steroidhormonrezeptormenge bzw. -verteilung durch die Applikation des Prostaglandins verändert wurde. Nach Schoon [78] wird bei einer in dieser Art eingeleiteten Geburt die Morphologie der Plazentareifung in keiner Weise beeinflusst. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Prostaglandin $F_{2\alpha}$ das Vorkommen der Steroidhormonrezeptoren in der Uteruswand kurzfristig modifiziert. Hinweise darauf gibt eine Untersuchung an der Plazenta des Rindes, bei der nach einer mit Glukokortikoiden eingeleiteten Geburt verfrüht Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden konnten [79]. Die intrafaktorielle Variabilität kann somit einem Bias unterliegen, auf die interfaktorielle Variabilität hat dieses jedoch keinen Einfluss unter der Voraussetzung der Homogenität der untersuchten Tiere.

Die Zuteilung der Feten anhand der Scheitel-Steiss-Länge zum achten bzw. neunten Trächtigkeitsmonat ist, obwohl üblich, nicht ganz unproblematisch, da es infolge genetischer Prädispositionen, subklinischer Infekte oder Unterernährung zu einer verzögerten Grössenentwicklung und demzufolge zur Einteilung in einen zu frühen Trächtigkeitsmonat kommen kann [71].

Der Vorteil des immunhistochemischen Steroidhormonrezeptornachweises gegenüber der biochemischen Methode liegt in der Möglichkeit der genauen Lokalisation des Rezeptors innerhalb des Gewebes und sogar seiner Zuordnung zu einzelnen Zellen. Die visuelle Bestimmung der Farbintensität der angefärbten Zellkerne und die wiederholt durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen berücksichtigten jedoch das Vorkommen von Interassayvariationen nicht und sind zudem zu einem gewissen Grad von der untersuchenden Person abhängig. Die in dieser Studie verglichenen Mittelwerte des IRS unterliegen also einem gewissen subjektiven Fehler, welcher aber durch zufällige Auswahl der Zellen bzw. mikroskopischen Felder in Grenzen gehalten werden kann.

7.2 Progesteronrezeptor-Nachweis

Die zur Lokalisation der Progesteronrezeptoren eingesetzte immunhistochemische Methode wurde am uterinen Gewebe bereits von Boos et al. [17] etabliert und auch der verwendete monoklonale Primärantikörper α PR6 aus der Maus vorgängig auf seine Kreuzreaktivität mit dem bovinen Progesteronrezeptor getestet [46].

Mit dieser Methode konnten Progesteronrezeptoren, ausser im Oberflächenepithel, in allen untersuchten Gewebeschichten der interplazentomären Uteruswand (oberflächliches und tiefes Stroma, Drüsenepithel, Myometrium) nachgewiesen werden. Das Vorkommen der Progesteronrezeptoren in den einzelnen Gewebeschichten steht im Einklang mit den Ergebnissen der Uteruswanduntersuchungen trächtiger Tiere von Kohtes [54] und Boos et al. [15] und ergänzt diese mit unter Geburt stehenden Tieren und Tieren post partum. Ebenso entspricht die in dieser Arbeit ermittelte Progesteronrezeptorverteilung den Resultaten von Arbeiten am zyklischen Uterus des Rindes, die ebenfalls im Stroma, in den Drüsen und im Myometrium Progesteronrezeptoren nachweisen konnten, welche in Abhängigkeit vom Hormonstatus mengenmässigen Veränderungen unterliegen. Der einzige Unterschied zum zyklischen Tier besteht im zusätzlichen Vorkommen von Progesteronrezeptoren im Oberflächenepithel am Zyklustag 6 bzw. 8 [17, 50, 72]. Dieser frühe Zeitraum der Trächtigkeit ist in der vorliegenden Studie allerdings nicht enthalten.

Die statistisch signifikanten Unterschiede im Vorkommen der Progesteronrezeptoren zwischen den einzelnen Zelltypen und ihr Fehlen im Oberflächenepithel ist dahingehend zu interpretieren, dass die einzelnen Gewebe- bzw. Zelltypen auf den selben hormonellen Stimulus in unterschiedlicher, gewebe- bzw. zellspezifischer Weise zu reagieren vermögen, wie dies auch von anderen Untersuchern bereits festgestellt worden ist [15, 50, 72, 83].

Die geburtseinleitenden hormonellen Veränderungen am Ende der Trächtigkeit, bestehend aus signifikant niederen Progesteronkonzentrationen (1,58 vs. 4,30ng/ml, siehe Tabelle 9.9), die aber immer noch über dem Schwellenwert von 1ng/ml für ein aktives zyklisches Corpus luteum liegen und einem Östrogenanstieg (nicht signifikant, Daten nicht aufgeführt), bleiben ohne Wirkung auf die Progesteronrezeptormenge in den immunhistochemisch untersuchten interplazentomären Gewebeschichten. Dieses Erkenntnis steht in einem klaren Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Studien. In mehreren Arbeiten an der interkarunkulären Uteruswand des Rindes während des Zyklus wurde übereinstimmend gezeigt, dass die Konzentration an Progesteronrezeptor- und Östrogenrezeptor-Proteinen in Abhängigkeit der Steroidhormonspiegel im Blut schwankt, sodass im Östrus ein hoher und während der Lutealphase ein tiefer PR- bzw. ER-Gehalt registriert werden konnte [17, 50, 53, 61, 72]. Auf diesen Nachweisen beruht die verbreitete, wenn auch teilweise bereits widerlegte [15, 17, 72] Hypothese, dass Östrogene einen stimulierenden Einfluss auf die Expression der ER und der PR haben,

während umgekehrt, Progesteron den stimulierenden Effekt der Östrogene auf die Exprimierung der Steroidhormonrezeptoren neutralisiert [48, 50, 106]. Entsprechende hormonbedingte Änderungen des Progesteronrezeptorgehalts konnten von Kohtes [54] und Boos et al. [16] auch in den maternalen Bindegewebszellen der Plazenta festgestellt werden. Diese Untersuchung zeigt eine signifikante Zunahme der Progesteronrezeptoren zwischen Tieren aus dem letzten Trächtigkeitsdrittel und Tieren mit einem eingeleiteten Kaiserschnitt, welche wahrscheinlich dem hormonellen Umschwung von einer langen progesterondominierten zu einer kurzen östrogendominierten Phase zuzuschreiben ist. In der Plazenta als peripartaler Quelle unkonjugierter Östrogene [44] dürften die Steroidhormonrezeptoren schon zu Beginn der hormonellen Umstellung unter dem Einfluss vergleichsweise höherer freier Östrogenspiegel stehen als in der interplazentomären Uteruswand, wohin die plazentären Östrogene erst nach einer Passage des grossen Kreislaufs und entsprechender Verdünnung gelangen. Dies und die Aktivierung des inaktiven Östronsulfats durch die im karunkulären Epithel lokalisierte Steroidsulfatase [39] sind wahrscheinlich die Gründe dafür, dass in der Plazenta, im Gegensatz zur interplazentomären Uteruswand, aufgrund des stärkeren Östrogeneinflusses eine Upregulation der Progesteronrezeptormenge festgestellt werden kann. Ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann, dass die von uns 27 Stunden nach der Geburtsinduktion mit Prostaglandinen gewonnenen Proben noch vor einem allfälligen Anstieg der Progesteronrezeptormenge erhoben wurden, da die Rezeptorproteine nach hormoneller Induktion erst mit einer gewissen Verzögerung exprimiert werden [27].

Die Frage, weshalb in der interplazentomären Uteruswand nach der langen Einwirkungszeit von Progesteron im achten und neunten Trächtigkeitsmonat weiterhin Progesteronrezeptoren im Stroma und im Myometrium vorhanden sind und weshalb die Progesteronrezeptormenge nicht, ähnlich wie im Zyklus oder in der Plazenta, auf die geburtsvorbereitenden Hormonschwankungen reagiert, ist weiterhin nicht schlüssig zu beantworten. Das Vorkommen von Progesteronrezeptoren in den Stromazellen trotz hoher Progesteronkonzentrationen deckt sich jedoch mit den Untersuchungen von Tseng et al. [92], die in menschlichen endometrialen Stromazellen eine Aufrechterhaltung der Progesteronrezeptoren durch deren eigenen Liganden feststellen konnten, während in anderen Zelltypen, insbesondere in Epithelzellen, die Progesteronrezeptoren durch Progestine downreguliert werden. Im Myometrium sind Progesteronrezeptoren, neben den EP₂-Rezeptoren für das Prostaglandin E₂ [2], bis unmittelbar vor die Geburt für eine weitge-

hende Ruhigstellung der glatten Uterusmuskulatur von grosser Wichtigkeit [22, 89, 90, 101]. Dass Progesteronrezeptoren in unverminderter Menge auch zum Geburtszeitpunkt und darüberhinaus nachweisbar sind, könnte mit einer gewissen Trägheit Ihrer Rückbildung zusammenhängen. Ausserdem ist ihre Rückbildung infolge des rasanten, der Geburt vorausgehenden Progesteronabfalls und dem damit verbundenen Abfall ihres Stimulus (siehe oben) eventuell gar nicht zwingend nötig. Eine funktionelle Downregulation der myometrialen Progesteronrezeptoren, zum Beispiel durch die Verminderung der Histon-Azetylase-Aktivität entfaltenden Coaktivatoren, wie sie beim Menschen nachgewiesen wurde [26], ist beim Rind unseres Wissens bisher nicht untersucht worden, würde aber einen weiteren Erklärungsansatz für den Fortbestand der Progesteronrezeptoren liefern.

Die Drüsenepithelien, die auch präpartum noch sekretorisch aktiv sind, weisen nur vereinzelte Rezeptoren für das die Sekretion stimulierende Progesteron auf. Es wird deshalb vermutet, dass die Drüsenepithelien nach einem progesteronbedingten Übergang vom Proliferations- zum Sekretionsstadium während der Frühträchtigkeit bis zum Ende der Trächtigkeit ohne direkte Einwirkung des Progesterons zur Sekretion befähigt bleiben [15]. Die Arbeit von Cunha et al. [28] untermauert diese These. Ihm gelang der Nachweis, dass Progesteron über parakrine Mechanismen, die durch die Bindung an Progesteronrezeptoren im benachbarten Stroma induziert werden, seine Wirkung auch in rezeptorarmen bzw. -losen Epithelien entfalten kann.

7.3 Östrogenrezeptor-Nachweis

Der für den immunhistochemischen Nachweis der Östrogenrezeptoren verwendete, in der Maus hergestellte monoklonale Antikörper Ab-8 (Clone AER311), ist gegen den Östrogenrezeptor α aus dem Uterus von Kälbern [1] entwickelt worden. Die immunhistochemische Färbeprozedur stellt eine Modifikation der bereits von Schuler et al. [82] angewendeten Methodik dar.

Unser Protokoll ermöglichte es, wenn auch lediglich in geringem Ausmass, den Östrogenrezeptor α in allen untersuchten Gewebeschichten der interplazentomären Uteruswand nachzuweisen. Dieses Ergebnis deckt sich bezüglich der Östrogenrezeptorverteilung mit der Untersuchung von Kohtes [54] und Boos et al. [15] an trächtigen Kühen sowie mit den Arbeiten an zyklischen Rindern [17, 50, 53, 72], Schafen [83] und Schweinen [87]. Anders als beim zyklischen Tier, sind beim Rind im peripartalen Zeitraum jedoch keinerlei Veränderungen der Östrogenrezeptormengen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der

Probenentnahme und somit des hormonellen Status feststellbar. Der Vergleich des Immunreaktiven Scores der einzelnen Gewebetypen hingegen fällt in knapp der Hälfte der Fälle positiv aus, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch Östrogene eine gewebespezifisch differenzierte Wirkung entfalten können. Für diese gewebespezifische Östrogenrezeptorverteilung könnte die transkriptionsmodulierende Wirkung von parakrinen Faktoren der entsprechenden Zellverbände bzw. des Embryos verantwortlich sein [84].

Die bisherigen immunhistochemischen Arbeiten an der Plazenta zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Boos et al. [16] registrierten signifikant höhere immunreaktive Scores für den Östrogenrezeptor α im karunkulären Stroma und Oberflächenepithel von Rindern mit eingeleiteter Geburt gegenüber jenen hochträchtiger Tiere, während Schuler et al. [82] eine signifikante Abnahme der Zahl Östrogenrezeptor α -positiven Zellkerne in den karunkulären Stromazellen zwischen trächtigen Tieren und Geburtstieren, die allerdings nicht eingeleitet wurden, feststellen konnten. Infolge der unterschiedlichen Art der Auswertung (IRS unter Berücksichtigung der Reaktionsintensität vs. Prozentsatz positiver Zellen) ist ein direkter Vergleich der beiden Studien problematisch; interessant ist jedoch wie kontrovers die beiden Autoren ihre Resultate interpretieren. Schulers Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Plazenta zum Zeitpunkt der Geburt, wie schon eine frühere Ligandbindungsstudie zeigt [75], relativ unempfindlich gegenüber Östrogenen ist, welche demzufolge höchstens marginal an den plazentären Reifungsvorgängen beteiligt sein können. Die Resultate von Boos et al. [16] weisen genau in die andere Richtung. Das Vorkommen von Östrogenrezeptor α in den plazentären Stroma- und Oberflächenepithelzellen während der gesamten Trächtigkeit und ihre wahrscheinlich durch steigende Plazentaöstrogenspiegel bedingte Upregulation [17, 50, 72] vor der Geburt sind Indizien für eine Beteiligung von Östrogenen an den plazentären Reifungsvorgängen.

Unabhängig davon, ob sich nun die Östrogenrezeptor α -Konzentration in der Plazenta kurz vor der Geburt verringert oder erhöht, verharnt sie im selben Zeitraum in der interkarunkulären Uteruswand auf unverändert niedrigem Niveau. Der fehlende Anstieg der Östrogenrezeptormenge trotz des unmittelbar präpartalen Anstiegs der freien Östrogene lässt sich, wie im vorangehenden Kapitel über die Progesteronrezeptoren, mit dem Verdünnungseffekt der Östrogene im grossen Kreislauf, der in der Plazenta vorhandenen Steroidsulfatase und der verzögerten Exprimierung der Rezeptorproteine nach hormoneller Induktion erklären.

Im Oberflächen- und Drüsenepithel sinkt der immunreaktive Score der Östrogenrezeptoren im Laufe der Trächtigkeit [54] trotz steigender Östrogenkonzentrationen im Plasma [35]. Im Oberflächenepithel ist dieser Östrogenrezeptorabfall von einer Reduktion der mit dem Proliferationsmarker Ki-67 positiv anfärbbaren Zellen begleitet [15]. Dies lässt vermuten, dass Östrogene einen Effekt auf die Proliferation und die Sekretionsleistung der Epithelzellen haben, welche insbesondere bei den Drüsenepithelien durch die Induktion der Proliferation zu Beginn der Trächtigkeit zustande kommt. Dafür spricht, dass Boos et al. [17] am 1. und 8. Zyklustag, also in den proliferationsaktiven Zyklusstadien Östrus und Metöstrus, die grösste Östrogenrezeptormenge im Drüsenepithel nachweisen konnten. Die Persistenz der Östrogenrezeptoren bis zur Geburt ist möglicherweise eine Voraussetzung für die bis zuletzt andauernde, die hämotrophe Ernährung ergänzende, histiotrophe Ernährung des Feten zu erklären, deren Vorkommen schon aufgrund der mikroskopischen Gestalt der grossen Drüsenzellen mit ihren runden, locker strukturierten Kernen angenommen werden kann (Abbildung 6.4).

Die gravierendsten Veränderungen unmittelbar vor der Geburt finden im Myometrium unter dem Einfluss der steigenden Östrogenkonzentrationen [35, 43] statt. Nach einer langen Phase der beinahe vollständigen Ruhigstellung [58] muss das Myometrium zur Austreibung des Feten und der Nachgeburt die Fähigkeit zur Kontraktion wieder erlangen. Dies geschieht einerseits durch die direkte Wirkung der Östrogene an ihren Rezeptoren in den glatten Muskelzellen des Myometriums, wo sie die Expression von kontraktionsassoziierten Proteinen (Actomyosin, Gap junctions, Ionenkanäle, Oxytocinrezeptoren) induzieren [49, 58]. Andererseits führt der Anstieg der Östrogensynthese über die Stimulierung der Prostaglandin-Synthase vom Typ 2 zu einer Zunahme der uterinen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion [23]. Während die Östrogenrezeptorkonzentration im Myometrium, die sich bereits im Verlauf der Trächtigkeit signifikant verringert hat [53], auch um den Geburtszeitpunkt auf einem unverändert tiefen Niveau verharret, konnten beim FP-Rezeptor für $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei Tieren mit induzierter Geburt signifikant höhere Rezeptorvorkommen gegenüber trächtigen Tieren ermittelt werden [95]. Das Myometrium scheint also durchaus in der Lage, mit der Regulation von Hormonrezeptoren auf den veränderten hormonellen Status des peripartalen Zeitraums zu reagieren, weshalb dies im Fall der Östrogene, denen in der Literatur im Bezug auf die Reaktivierung des Myometriums [44, 49, 58] eine nicht unwesentliche Rolle zugeordnet wird, nicht der

Fall ist, bedarf weiterer Abklärungen.

7.4 Glukokortikoidrezeptor-Nachweis

Zur immunhistochemischen Detektion der Glukokortikoidrezeptoren wurde in dieser Studie der im Kaninchen hergestellte, polyklonale, gegen ein aminoterminal gelegenes 22 Aminosäuren langes Peptid, welches in der humanen Isoform α und β des Glukokortikoidrezeptor vorkommt [25], gerichtete Antikörper PA1-511 eingesetzt. Dieser Antikörper wurde mit ähnlicher Methodik bereits erfolgreich für Untersuchungen an der interplazentomären Uteruswand und am Plazentom von Rind [16, 15] und Schaf [42] verwendet.

Mittels immunhistochemischer Anfärbung konnten in der interplazentomären Uteruswand, wenn auch zum Teil nur in sehr geringem Umfang, Glukokortikoidrezeptoren im Oberflächenepithel, im oberflächlichen und tiefen Stroma, in den Drüsenepithelien sowie im Myometrium nachgewiesen werden. Vergleichbare Literatur über die Verteilung der Glukokortikoidrezeptoren in der Uteruswand bzw. Plazenta existiert bis anhin nur wenig. Lediglich Kohtes [54] und Boos et al. [15] beim Rind und Gupta et al. [42] beim Schaf haben die Glukokortikoidrezeptor-Verteilung untersucht, alle konnten jedoch, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, keine Glukokortikoidrezeptoren im maternalen Stroma und im Myometrium nachweisen. Bei der Frau hingegen werden im Zyklus Glukokortikoidrezeptoren in erster Linie in den Fibroblasten der Lamina propria exprimiert [62, 5], können aber, in geringer Zahl, auch im Drüsenepithel vorkommen [62]. Aufgrund ihrer Lokalisation im endometrialen Stroma wird den Glukokortikoidrezeptoren bei der Frau eine funktionelle Rolle bei der Steuerung des komplexen morphologischen und biochemischen Wandels während der späten Lutealphase des Menstrualzyklus' zugeschrieben [5]. Auch im uterinen Homogenat der Stute gelang der Glukokortikoidrezeptornachweis [24]. Allerdings wurde die zell- oder gewebetypische Verteilung der Rezeptoren beim Pferd noch nicht untersucht.

Beim Vergleich des Glukokortikoidrezeptor-IRS der einzelnen Gewebeschichten in Vergleichsgruppe A fällt auf, dass das Oberflächenepithel mit wenigen Ausnahmen signifikant höhere IRS aufweist als die anderen Schichten bzw. Zelltypen. Auch der Vergleich des oberflächlichen Stromas mit dem tiefen Stroma und dem Drüsenepithel sowie dem Myometrium mit dem Drüsenepithel fällt mehrheitlich signifikant aus. Die daraus resultierende gewebetypische Rezeptorverteilung dürfte folglich ein Indiz sein für die Fähigkeit der einzelnen Zell- bzw. Gewebetypen eine individuelle Antwort auf den

selben hormonellen Reiz zu entwickeln. Die tierartspezifische Verteilung der Glucocorticoidrezeptoren ist bereits aus den wenigen vorliegenden Arbeiten klar ersichtlich [15, 42, 54]

Die bisher einzige Untersuchung an der bovinen Plazenta zeigt in den maternalen Kryptenepithelzellen einen von der Lokalisation unabhängigen signifikanten Anstieg der Glukokortikoidrezeptormenge zwischen dem letzten Trächtigkeitsdrittel und Tieren unter induzierter Geburt [15, 54]. Kryptenepithelien scheinen offenbar wichtige Zielzellen für Glukokortikoide während der Plazentareifung und für die Geburtsinduktion beim Rind zu sein [16, 54]. Überdies erklärt das Trächtigkeitsstadium-abhängige Vorkommen der Glukokortikoidrezeptoren [15, 16, 54] die Tatsache, dass bei Tieren mit normal entwickelter Plazenta mit Glukokortikoiden nur in den letzten drei Trächtigkeitsmonaten ein Abort induziert werden kann. Voraussetzung dafür sind intakte fetale Membranen bzw. Plazentome [4].

Die Rolle der interplazentomären Uteruswand in Bezug auf die Geburtsinduktion mittels Glukokortikoiden wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite ziehen Boos et al. [16] aufgrund ihres immunhistochemischen Nachweises von Glukokortikoidrezeptoren im endometrialen Oberflächenepithel eine Beteiligung in Betracht. Auf der anderen Seite läuft die von Whittle et al. [102] propagierte geburtsauslösende endokrine Kaskade ohne jegliche Aktivierung der maternalen Glukokortikoidrezeptoren ab, wobei die offensichtlich auftretenden Unterschiede in der plazentären Lokalisation der Glukokortikoidrezeptoren berücksichtigt werden muss. Der in dieser Studie erstmals gezeigte signifikante Anstieg der Glukokortikoidrezeptoren zwischen hochträchtigen Tieren und Tieren mit eingeleitetem Kaiserschnitt im oberflächlichen bzw. tiefen Stroma ist als weiteres Indiz für eine funktionelle Bedeutung der Glukokortikoide in Bezug auf die interplazentomäre Uteruswand im entsprechenden Zeitraum zu werten. Zu welchem Zweck die Glukokortikoide ihre Rezeptoren im Stroma aktivieren, bleibt jedoch weiterhin unklar. Denkbar wäre zum Beispiel eine Prostaglandinsynthese im Stroma selbst, wo zumindest ein Teil der hierfür benötigten Enzyme (COX-2) bereits immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte [2]. Auch weitere, bisher unerforschte Funktionen der Glukokortikoide dürfen nicht ausgeschlossen werden.

In Folge fehlender Untersuchungen bleibt die exakte Rolle der Glukokortikoidrezeptoren in Oberflächenepithel, Myometrium und Drüsenepithel weiterhin unklar. Im letzteren kann

aufgrund der über die gesamte Trächtigkeit vorkommenden Glukokortikoidrezeptoren eine Beteiligung an der Steuerung der Sekretion von Embryotrophe bzw. eine Modulation von deren Zusammensetzung nicht ausgeschlossen werden [54].

7.5 Schlussfolgerung

Die Induktion der Geburt ist ein sehr komplexer und bislang nicht vollständig verstandener Vorgang, an welchem, zusätzlich zu den in dieser Studie untersuchten Hormonen und deren Rezeptoren, eine Vielzahl weiterer, zum Teil erst rudimentär erforschter Faktoren und Mechanismen beteiligt sind, die überdies in Abhängigkeit vom uterinen Gewebe- bzw. Zelltyp variieren.

Der immunhistochemische Nachweis der Steroidhormonrezeptoren in der interplazentomären Uteruswand und deren mengenmässige Veränderung im Verlaufe der peripartalen Periode vermag erste Einblicke in die Wirkungsorte der einzelnen Hormone zu vermitteln, genügt aber zum vollständigen Verständnis der Rolle der Uteruswand im Rahmen der Geburtsinduktion nicht, da die Folgen der Hormoneinwirkungen weiterhin grossenteils unverstanden bleiben.

Dennoch stellt die Immunhistochemie eine Möglichkeit einer ersten Standortbestimmung dar, aufgrund derer, in Kombination mit weiterer Forschung, zum Beispiel auf dem Gebiet der Biochemie, Molekularbiologie sowie Physiologie, weiter in Details vorgedrungen werden kann.

7.6 Ausblick

Zukünftige immunhistochemische Untersuchungen mit dem Ziel, die Beteiligung der interkarunkulären Uteruswand an der Geburtsinduktion zu verstehen, wird vermutlich vermehrt auch die verschiedenen Isoformen der einzelnen Rezeptoren berücksichtigen müssen, wie dies im Rahmen von Untersuchungen an der Plazenta bereits praktiziert wird [80].

Vielversprechend stellt sich auch die In-vitro-Kultivierung der einzelnen uterinen Zelltypen dar. Die hormonelle Stimulierung dieser Zellkulturen und die anschliessende Messung allfälliger als Reaktion auf den Stimulus produzierter Hormone wird voraussichtlich viel zum besseren Verständnis der Hormonwirkungen beitragen können.

Quantitative Methoden mit hoher Sensitivität könnten die Aussagekraft der Uteruswandforschung deutlich steigern und die zur Zeit praktizierten semiquantitativen Verfahren ersetzen.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Abbondanza, C., de Falco, A., Nigro, V., Medici, N., Armetta, I., Molinari, A. M., Moncharmont, B., Puca, G. A., 1993: Characterization and epitope mapping of a new panel of monoclonal antibodies to estradiol receptor. *Steroids* 58, 4-12.
- 2 Arosh, J. A., Banu, S. K., Chapdelaine, P., Fortier, M. A., 2004: Temporal and tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, EP3, EP4, FP, and cyclooxygenases 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. *Endocrinology* 145, 407-417.
- 3 Atkinson, B. A., King, G. J., Amoroso, E. C., 1984: Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 30, 763-774.
- 4 Aurich, J. E., Aurich, Chr., 1994: Geburtseinleitung bei Haustieren. *Der praktische Tierarzt* 75, 742-750.
- 5 Bamberger, A. M., Milde-Langosch, K., Loning, T., Bamberger, C. M., 2001: The glucocorticoid receptor is specifically expressed in the stromal compartment of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5071-5074.
- 6 Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., de Castro, M., Chrousos, G. P., 1995: Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95, 2435-2441.
- 7 Beato, M., Chavez, S., Truss, M., 1996: Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61, 240-251.

- 8 Behrens, C., Aurich, J. E., Klug, E., Naumann, H., Hoppen, H. O., 1993: Inhibition of gonadotrophin release in mares during the luteal phase of the oestrous cycle by endogenous opioids. *J Reprod Fertil* 98, 509-514.
- 9 Birgel, E. H., Zerbe, H., Grunert, E., 1996: Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen. *Der praktische Tierarzt* 7, 627-630.
- 10 Björkmann, N., 1956: Morphological studies on the epithelia of the intercotyledonary component of the bovine placenta. *Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavia* 1, 41-50.
- 11 Björkmann, N., 1954: Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anat Suppl* 22/2, 1-91.
- 12 Böck, P., 1989: *Romeis Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München.
- 13 Boenisch, T., 2003: Färbemethoden - Detektionsysteme. In: Boenisch, T.: *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*. 3. Auflage, DakoCytomation, Hamburg.
- 14 Boos, A., 1981: Histomorphologische Veränderungen im Endometrium des Rindes während der verschiedenen Zyklusphasen. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 15 Boos, A., Kohtes, J., Janssen, V., Mulling, C., Stelljes, A., Zerbe, H., Hassig, M., Thole, H. H., 2006: Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. *Anim Reprod Sci* 91, 55-76.

- 16 Boos, A., Kohtes, J., Stelljes, A., Zerbe, H., Thole, H. H., 2000: Immunohistochemical assessment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth with or without retention of fetal membranes. *J Reprod Fertil* 120, 351-360.
- 17 Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R., Grunert, E., 1996: Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 44, 11-21.
- 18 Boos, A., Stelljes, A., Kohtes, J., 2003: Collagen types I, III and IV in the placentome and interplacentomal maternal and fetal tissues in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Cells Tissues Organs* 174, 170-183.
- 19 Bourne, J., 1983: *Handbuch der Immunoperoxidase Färbemethoden*. Dako Corporation, Carpinteria (CA, USA).
- 20 Bramley, T., 2003: Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125, 3-15.
- 21 Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M., 1997: Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
- 22 Challis, J. R., Matthews, S. G., Gibb, W., Lye, S. J., 2000: Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 21, 514-550.
- 23 Challis, J. R., Sloboda, D. M., Alfaidy, N., Lye, S. J., Gibb, W., Patel, F. A., Whittle, W. L., Newnham, J. P., 2002: Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 124, 1-17.
- 24 Chavatte-Palmer, P., Duchamp, G., Palmer, E., Ousy, J. C., Rossdale, P. D., Lombès, M., 2000: Progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptor in the uterus and mammary glands of mares from mid- to late gestation. *J Reprod Fertil Suppl* 56, 661-672.

- 25 Cidlowski, J. A., Bellingham, D. L., Powell-Oliver, F. E., Luban, D. B., Sar, M., 1990: Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmic and nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 4, 1427-1437.
- 26 Condon, J. C., Jeyasuria, P., Faust, J. M., Wilson, J. W., Mendelson, C. R., 2003: A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9518-9523.
- 27 Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Lamartiniere, C. A., 2005: Dynamic profiling of estrogen receptor and epidermal growth factor signaling in the uteri of genistein- and estrogen-treated rats. *Food and Chem Toxicol* 43, 637-645.
- 28 Cunha, G. R., Cooke, P. S., Kurita, T., 2004: Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67, 417-434.
- 29 Demmers, K. J., Derecka, K., Flint, A., 2001: Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 121, 41-49.
- 30 Denner, L. A., Weigel, N. L., Maxwell, B. L., Schrader, W. T., O'Malley, B. W., 1990: Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740-1743.
- 31 Dhaliwal, G. S., Murray, R. D., Rees, E. M., Howard, C. V., Beech, D. J., 2002: Quantitative unbiased estimates of endometrial gland surface area and volume in cycling cows and heifers. *Res Vet Sci* 73, 259-265.
- 32 Dixon, R., Hyman, A., Gurpide, E., Dyrenfurth, I., Cohen, H., Bowe, E., Engel, T., Daniel, S., James, S., Vande Wiele, R., 1970: Feto-maternal transfer and production of cortisol in the sheep. *Steroids* 16, 771-789.
- 33 Dobson, H., Smith, R. F., 2000: What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 60-61, 743-752.

- 34 Döcke, F., 1994: Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.
- 35 Eissa, H. M., El-Belely, M. S., 1990: Sequential changes in plasma progesterone, total oestrogens and corticosteroids in the cow throughout pregnancy and around parturition. *Br Vet J* 146, 24-29.
- 36 Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M., 2000: Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52, 513-556.
- 37 Fliss, A. E., Benzeno, S., Rao, J., Caplan, A. J., 2000: Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72, 223-230.
- 38 Gray, C. A., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Spencer, T. E., 2002: Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124, 289-300.
- 39 Greven, H., Ugele, B., Rex-Haffner, M., Schuler, G., 2005: Immunolocalisation of steroid sulfatase in bovine placentomes. Abstract, 38. Jahrestag. *Physiol. Pathol. Fortpfl., Zürich, Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 147, 59.
- 40 Gronemeyer, H., Turcotte, B., Quirin-Stricker, C., Bocquel, M. T., Meyer, M. E., Krozowski, Z., Jeltsch, J. M., Lerouge, T., Garnier, J. M., Chambon, P., 1987: The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis. *EMBO J* 6, 3985-3994.
- 41 Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., Milgrom, E., 1989: Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57, 1147-1154.
- 42 Gupta, S., Gyomerey, S., Lye, S. J., Gibb, W., Challis, J. R., 2003: Effect of labor on glucocorticoid receptor (GR(Total), GRalpha, and GRbeta) proteins in ovine intrauterine tissues. *J Soc Gynecol Investig* 10, 136-144.

- 43 Hoffmann, B., Goes de Pinho, T., Schuler, G., 1997: Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105, 296-303.
- 44 Hoffmann, B., Schuler, G., 2002: The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* 23, 309-320.
- 45 Hudson, S., Mullford, M., Whittlestone, W. G., Payne, E., 1976: Bovine plasma corticoids during parturition. *J Dairy Sci* 59, 744-746.
- 46 Hurd, C., Nakao, M., Eliezer, N., Moudgil, V. K., 1991: Immunoanalysis of calf uterine progesterone receptor: modulation of receptor-associated 90 kDa heat-shock protein. *Mol. Cell. Biochem.* 105, 73-83.
- 47 Hydbring, E., Madej, A., MacDonald, E., Drugge-Boholm, G., Berglund, B., Olsson, K., 1999: Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. *J Endocrinol* 160, 75-85.
- 48 Ing, N. H., Tornesi, M. B., 1997: Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 56, 1205-1215.
- 49 Jenkin, G., Young, I.R., 2004: Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Anim Reprod Sci* 82-83, 567-581.
- 50 Kimmins, S., MacLaren, L. A., 2001: Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22, 742-748.
- 51 Kindahl, H., Kornmatitsuk, B., Gustafsson, H., 2004: The cow in endocrine focus before and after calving. *Reprod Dom Anim* 39, 217-221.

- 52 King, G. J., Atkinson, B. A., Robertson, H. A., 1981: Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. *J. Reprod. Fert.* 61, 469-474.
- 53 Klauke, M., Hoffmann, B., 1992: Progesterone and estrogen receptors in the myometrium of the cow during the estrous cycle and pregnancy and of the sheep at the time of parturition. *Anim Reprod Sci* 29, 195-203.
- 54 Kohtes, J., 1998: Immunhistochemische Untersuchung zum Vorkommen und zur Verteilung von Steroidhormonrezeptoren in den Fruchthüllen und in der Uteruswand des Rindes. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 55 Kumar, R., Thompson, E. B., 1999: The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319.
- 56 Leiser, R., 1999: Weibliche Geschlechtsorgane. In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E.: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 8. Auflage, Band II, Parey Buchverlag, Berlin, 393-439.
- 57 Liebich, H.-G., 1993: *Funktionelle Histologie*. Schattauer, Stuttgart.
- 58 Lye, S. J., 1996: Initiation of parturition. *Anim Reprod Sci* 42, 495-503.
- 59 Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., Chambon, P., 1989: Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338, 271-274.
- 60 Meinecke, B., 2005: Reproduktion bei weiblichen Haussäugetieren. In: Von Engelhardt, W., Breves, G.: *Physiologie der Haustiere*. 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 495-517.
- 61 Meyer, H. H., Mittermeier, T., Schams, D., 1988: Dynamics of oxytocin, estrogen and progestin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. *Acta Endocrinol* 118, 96-104.

- 62 Moutsatsou, P., Sekeris, C. E., 2003: Steroid receptors in the uterus: implications in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 997, 209-222.
- 63 Nelson, D., Cox, M., 2001: *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage, Springer, Berlin.
- 64 Noll, S., Schaub-Kuhnen, S., 2000: *Praxis der Immunhistochemie*. Höfler, H., Müller, K., 1. Auflage, Urban & Fischer, München.
- 65 Patel, O. V., Takahashi, T., Takenouchi, N., Hirako, M., Sasaki, N., Domeki, I., 1996: Peripheral cortisol levels throughout gestation in the cow: effect of stage of gestation and foetal number. *Br Vet J* 152, 425-432.
- 66 Peterson, C. M., 2000: Estrogen and progesterone receptors: an overview from the year 2000. *J Soc Gynecol Investig Suppl* 1, 3-7.
- 67 Power, R. F., Mani, S. K., Codina, J., Conneely, O. M., O'Malley, B. W., 1991: Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254, 1636-1639.
- 68 Priedkalns, J., 1987: Femal Reproduction Tract. In: Dellmann, H. D., Brown, E. M.: *Textbook of Veterinary Histology*. 3. Auflage, Lea & Febiger, Philadelphia, 313-339.
- 69 Purinton, S. C., Wood, C. E., 2002: Oestrogen augments the fetal ovine hypothalamus- pituitary-adrenal axis in response to hypotension. *J Physiol* 544, 919-929.
- 70 Rausch, W.D., Hofer, A., Gemeiner, M., Möstl, E., 1989: Katecholamin- und Cortisolkonzentrationen im Plasma von Rindern um die Geburt. *J. vet. med. A* 36, 218-224.
- 71 Richter, J., Götze, R., 1993: *Tiergeburtshilfe*. 4. Auflage, Parey Verlag, Berlin.

- 72 Robinson, R. S., Mann, G. E., Lamming, G. E., Wathes, D. C., 2001: Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122, 965-979.
- 73 Rosenfeld, C. S., Yuan, X., Manikkam, M., Calder, M. D., Garverick, H. A., Lubahn, D. B., 1999: Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle. *Biol Reprod* 60, 691-697.
- 74 Sartorius, C. A., Melville, M. Y., Hovland, A. R., Tung, L., Takimoto, G. S., Horwitz, K. B., 1994: A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8, 1347-1360.
- 75 Sauerwein, H., Meyer, H. H., Möstl, E., 1989: Low sensitivity to oestrogens in bovine placenta at term. *Zentralbl Veterinarmed A* 36, 236-240.
- 76 Schlafer, D. H., Fisher, P. J., Davies, C. J., 2000: The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci* 145-160.
- 77 Schnorr, B., Kressin, M., 2001: *Embryologie der Haustiere*. 4. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.
- 78 Schoon, A., 1989: Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität. *Habilitationsschrift Tierärztliche Hochschule Hannover*.
- 79 Schoon, H. A., Schoon, D., 1991: Reifungsvorgänge der bovinen Plazentome in der Endphase der Trächtigkeit. Bericht, 19. Kongress DVG Deutsche vet.-med. Gesellschaft, Giessen, 67-80.
- 80 Schuler, G., Teichmann, U., Taubert, A., Failing, K., Hoffmann, B., 2005: Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed differently from ERalpha in bovine placentomes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113, 107-114.

- 81 Schuler, G., Wirth, C., Klisch, K., Pfarrer, C., Leiser, R., Hoffmann, B., 1999: Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod* 61, 797-801.
- 82 Schuler, G., Wirth, Ch., Teichmann, U., Failing, K., Leiser, R., Thole, H., 2002: Occurrence of estrogen receptor alpha in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod* 66, 976-982.
- 83 Spencer, T. E., Bazer, F. W., 1995: Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 53, 1527-1543.
- 84 Spencer, T. E., Gray, A., Johnson, G. A., Taylor, K. M., Gertler, A., Gootwine, E., Ott, T. L., Bazer, F. W., 1999: Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. *Biol Reprod* 61, 1409-1418.
- 85 Squires, E. J., 2003: Applied animal endocrinology. Squires, E. J., 1. Auflage, CABI Publishing, Wallingford (UK).
- 86 Stallcup, M. R., 2001: Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* 20, 3014-3020.
- 87 Sukjumlong, S., Kaeoket, K., Dalin, A. M., Persson, E., 2003: Immunohistochemical studies on oestrogen receptor alpha (ER alpha) and the proliferative marker Ki-67 in the sow uterus at different stages of the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim* 38, 5-12.
- 88 Sullivan, W. P., Beito, T. G., Proper, J., Krco, C. J., Toft, D. O., 1986: Preparation of monoclonal antibodies to the avian progesterone receptor. *Endocrinology* 119, 1549-1557.
- 89 Taverne, M. A., Breeveld-Dwarkasing, V. N., van Dissel-Emiliani, F. M., Bevers, M. M., de Jong, R., van der Weijden, G. C., 2002: Between prepartum luteolysis and onset of expulsion. *Domest Anim Endocrinol* 23, 329-337.

- 90 Taverne, M. M., de Schwartz, N. C., Kankofer, M., Bevers, M. M., van Oord, H. A., Schams, D., Gutjahr, S., van der Weijden, G. C., 2001: Uterine responses to exogenous oxytocin before and after pre-partum luteolysis in the cow. *Reprod Domest Anim* 36, 267-272.
- 91 Tsai, M. J., O'Malley, B. W., 1994: Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-486.
- 92 Tseng, L., Zhu, H. H., 1997: Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 57, 1360-1366.
- 93 Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., Evans, R. M., 1991: Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.
- 94 Walters, M. R., Nemere, I., 2004: Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci* 61, 2309-2321.
- 95 Wehbrink, D., 2005: Expression of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) and Prostaglandin Receptors EP2 and FP: An Immunohistochemical Study of the Bovine Interplacentomal Uterine Wall Around Term. Dissertation Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich.
- 96 Weigel, N. L., 1996: Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319, 657-667.
- 97 Weigel, N. L., Zhang, Y., 1998: Ligand-independent activation of steroid hormone receptors.. *J Mol Med* 76, 469-479.
- 98 Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E. R., Warner, M., Gustafsson, J. A., 2003: Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 546, 17-24.
- 99 Weyrauch, K. D., Smollich, A., 1998: Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Enke Verlag, Stuttgart.

- 100 Whitfield, G. K., Jurutka, P. W., Haussler, C. A., Haussler, M. R., 1999: Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem Suppl* 32/33, 110-122.
- 101 Whittle, W. L., Patel, F. A., Alfaidy, N., Holloway, A. C., Fraser, M., Gyomerey, S., Lye, S. J., Gibb, W., Challis, J. R., 2001: Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. *Biol Reprod* 64, 1019-1032.
- 102 Whittle, W. L., Patel, F. A., Alfaidy, N., Holloway, A. C., Fraser, M., Gyomerey, S., Lye, S. J., Gibb, W., Challis, J. R., 2001: Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. *Biol Reprod* 64, 1019-1032.
- 103 Williams, S. P., Sigler, P. B., 1998: Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393, 392-396.
- 104 Wood, C. E., 1999: Control of parturition in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* 54, 115-126.
- 105 Wu, J., Grunstein, M., 2000: 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* 25, 619-623.
- 106 Xiao, C. W., Goff, A. K., 1999: Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *J Reprod Fertil* 115, 101-109.
- 107 Yamauchi, N., Takezawa, T., Kizaki, K., Herath, C. B., Hashizume, K., 2003: Proliferative potential of endometrial stromal cells, and endometrial and placental expression of cyclin in the bovine. *J Reprod Dev* 49, 553-560.
- 108 Yamauchi, S., Kakishita, T., Kotera, K., 1969: Histological study of the pregnant uterus in the cow. II. General histological study on the uterine glands. *Bulletin of University of Osaka Prefecture Ser. B*, Vol. 21, 147-166.

- 109 Zdunczyk, S., Janowski, T., Ras, A., 1989: Einfluss von Transport auf den Steroidhormonspiegel bei hochtragenden Kühen. Zuchthygiene 24, 159.
- 110 Zhang, Y., Bai, W., Allgood, V. E., Weigel, N. L., 1994: Multiple signaling pathways activate the chicken progesterone receptor. Mol Endocrinol 8, 577-584.
- 111 Zheng, J., Johnson, M. L., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., 1996: Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation, and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy. Endocrinology 137, 340-348.

9 Anhang

9.1 Pufferlösungen

9.1.1 TBS

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) wurde als Standardpuffer zur Spülung der Schnitte und zur Verdünnung von Lösungen eingesetzt. Die Arbeitslösung wurde durch Verdünnung von 100ml Tris-Puffer 0.05M, pH 7.6 ± 0.2 (Stammlösung) mit 900ml 0.85% Kochsalzlösung hergestellt.

Zur Herstellung der Stammlösung 6.1g Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethan) in 50ml Aqua dest. lösen und anschliessend mit 37ml einer 1N Salzsäure versetzen und mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen [19].

9.1.2 Citrat

Eingesetzt als Puffer für die Antigendemaskierung.

Das ProTaq Citrat-Puffer-Konzentrat pH 6 (Mediate, Nunningen, Schweiz) gemäss Anleitung mit Aqua dest. auf einen Liter verdünnen.

9.1.3 TEC

Dieser Puffer wurde zur Antigendemaskierung eingesetzt, wenn mit Citratpuffer nur eine sehr schwache Färbung erreicht werden konnte.

2.5g Tris-Base, 5.0g EDTA und 3.2g Tris-Natrium-Citrat in Aqua dest. auflösen, pH auf 7.8 einstellen und anschliessend mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen. Vor dem Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

9.1.4 Tris-EDTA

Tris-EDTA Puffer wurde mit sehr gutem Erfolg bei schwachen oder falsch negativen Färbungen eingesetzt. Die gründliche Freilegung der Antigene ist leider häufig mit einer

starken Hintergrundfärbung gekoppelt, welche aber mit einem Avidin-Biotin-Block eingedämmt werden kann.

1.21g Tris-Base und 0.37g EDTA in 1000ml Aqua dest. gelöst ergibt eine Lösung mit pH 9. Anschliessend 0.5ml Tween 20 zugeben und gut schütteln.

9.2 Immunhistochemische Protokolle

Die im Folgenden aufgeführten immunhistochemischen Protokolle sind im Aufbau prinzipiell identisch. Die Abweichungen sind einerseits eine Folge des unterschiedlichen Bindungsverhalten der verwendeten Antikörper und andererseits mit dem unterschiedlichen Grad der Bildung formalininduzierten chemischer Quervernetzungen zwischen den Antigenen [13] zu erklären.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung wurde bei allen Nachweisen identisch und gemäss dem Protokoll in Tabelle 9.1 vorgenommen.

Tabelle 9.1: Entparaffinierung und Rehydrierung

Dauer	Reagens
10 Minuten	Xylol I
10 Minuten	Xylol II
10 Minuten	Xylol III
5 Minuten	100% Alkohol I
5 Minuten	100% Alkohol II
5 Minuten	96% Alkohol I
5 Minuten	96% Alkohol II
5 Minuten	70% Alkohol I
5 Minuten	70% Alkohol II
5 Minuten	Aqua dest. I
5 Minuten	Aqua dest. II

Tabelle 9.2: Protokoll des Progesteronrezeptor-Nachweises

Monoklonaler Progesteron-Rezeptor Antikörper α PR6 Department of Cell Biology, Mayo Medical School Rochester, Minnesota, USA	
Dauer	Reagens/Behandlung
	Entparaffinierung/Rehydrierung gemäss Tabelle 9.1
3 x 4 Minuten	Aufheizen in Citratpuffer auf 103°C, Mikrowelle, 600W
20 Minuten	Antigendemaskierung in Citratpuffer, Mikrowelle, 600W
10 Minuten	Abkühlen in frischem Citratpuffer
5 Minuten	3% H ₂ O ₂ in Aqua dest.
20 Minuten	Spülen in TBS
10 Minuten	Inkubation mit Normalserum
	Proteinblock
60 Minuten	Inkubation mit Primärantikörper, 1/500
5 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit sekundärem Antikörper
5 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit ABC-Komplex
5 Minuten	Spülen in TBS
2 Minuten	Inkubation mit DAB
5 Minuten	Spülen in TBS
20 Sekunden	Kernfärbung
15 Minuten	Bläuen unter fliessendem Wasser
20 Sekunden	70% Alkohol
20 Sekunden	96% Alkohol
2 Minuten	100% Alkohol
5 Minuten	Xylol
	Eindecken

Tabelle 9.3: Protokoll des Oestrogenrezeptor-Nachweises in Vergleichsgruppe A

Monoklonaler Estrogen Receptor Ab-8 (Clone AER 311)
Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA
Cat # MS-175-P1

Dauer	Reagens/Behandlung
	Entparaffinierung/Rehydrierung gemäss Tabelle 9.1
3 x 4 Minuten	Aufheizen in Citratpuffer auf 103°C, Mikrowelle, 600W
10 Minuten	Antigendemaskierung in Citratpuffer, Mikrowelle, 600W
10 Minuten	Abkühlen in frischem Citratpuffer
5 Minuten	2% H ₂ O ₂ in Aqua dest.
20 Minuten	Spülen in TBS
10 Minuten	Inkubation mit Normalserum
	Proteinblock
20 Stunden	Inkubation mit Primärantikörper, 1/50
5 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit sekundärem Antikörper
5 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit ABC-Komplex
5 Minuten	Spülen in TBS
2.5 Minuten	Inkubation mit DAB
5 Minuten	Spülen in TBS
15 Sekunden	Kernfärbung
15 Minuten	Bläuen unter fliessendem Wasser
20 Sekunden	70% Alkohol
20 Sekunden	96% Alkohol
2 Minuten	100% Alkohol
5 Minuten	Xylol
	Eindecken

Tabelle 9.4: Protokoll des Oestrogenrezeptor-Nachweises in Vergleichsgruppe B

Monoklonaler Estrogen Receptor Ab-8 (Clone AER 311)
 Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA
 Cat # MS-175-P1

Dauer	Reagens/Behandlung
	Entparaffinierung/Rehydrierung gemäss Tabelle 9.1
30 Minuten	TEC-Puffer auf 95 - 97°C vorheizen
20 Minuten	Antigendemaskierung in TEC-Puffer, Wasserbad
10 Minuten	Abkühlen im heissen TEC-Puffer
5 Minuten	2% H ₂ O ₂ in Aqua dest.
20 Minuten	Spülen in TBS
10 Minuten	Inkubation mit Normalserum
	Proteinblock
20 Stunden	Inkubation mit Primärantikörper, 1/50
5 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit sekundärem Antikörper
5 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit ABC-Komplex
5 Minuten	Spülen in TBS
3.5 Minuten	Inkubation mit DAB
5 Minuten	Spülen in TBS
15 Sekunden	Kernfärbung
15 Minuten	Bläuen unter fliessendem Wasser
20 Sekunden	70% Alkohol
20 Sekunden	96% Alkohol
2 Minuten	100% Alkohol
5 Minuten	Xylol
	Eindecken

Tabelle 9.5: Protokoll des Glukokortikoidrezeptor-Nachweises

Polyklonaler Glucokortikoid-Rezeptor Antikörper Affinity BioReagents, Golden, CO, USA Cat # PA1-511A	
Dauer	Reagens/Behandlung
	Entparaffinierung/Rehydrierung gemäss Tabelle 9.1
15 Minuten	Tris-EDTA-Puffer auf 95 - 97°C vorheizen
20 Minuten	Antigendemaskierung in Tris-EDTA-Puffer, Wasserbad
10 Minuten	Abkühlen im heissen Tris-EDTA-Puffer
3 x 3 Minuten	2% H ₂ O ₂ in Aqua dest.
20 Minuten	Spülen in TBS
	Avidin-Block
	Abspülen mit TBS
20 Minuten	Biotin-Block
	Abspülen mit TBS
20 Minuten	Inkubation mit Normalserum
10 Minuten	Proteinblock
20 Stunden	Inkubation mit Primärantikörper, 1/300
3 x 3 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit sekundärem Antikörper
3 x 3 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit ABC-Komplex
3 x 3 Minuten	Spülen in TBS
5 Minuten	Inkubation mit DAB
3 x 3 Minuten	Spülen in TBS
20 Sekunden	Kernfärbung
15 Minuten	Bläuen unter fliessendem Wasser
20 Sekunden	70% Alkohol
20 Sekunden	96% Alkohol
2 Minuten	100% Alkohol
5 Minuten	Xylol
	Eindecken

9.3 Vergleich der Gewebeschichten

Tabelle 9.6: Vergleich des Progesteronrezeptorvorkommens in den verschiedenen Gewebeschichten. S = signifikant; ns = nicht signifikant

Vergleich	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3
OSTR – TSTR	ns	s	ns	ns	ns	s	ns
OSTR – GE	s	s	s	s	s	s	s
OSTR – MYO	s	s	s	s	s	s	s
TSTR – GE	s	s	s	s	s	s	ns
TSTR – MYO	s	s	s	s	s	s	s
MYO – GE	s	s	s	s	s	s	s

Tabelle 9.7: Vergleich des Östrogenrezeptorvorkommens in den verschiedenen Gewebeschichten. S = signifikant; ns = nicht signifikant

Vergleich	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3
OE – OSTR	s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OE – TSTR	s	s	s	ns	ns	s	ns
OE – GE	ns	ns	ns	ns	s	s	s
OE – MYO	ns	ns	ns	ns	s	s	s
OSTR – TSTR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OSTR – GE	s	ns	ns	s	s	s	s
OSTR – MYO	ns	ns	ns	ns	s	s	s
TSTR – GE	s	s	s	s	s	s	s
TSTR – MYO	s	s	ns	ns	s	s	s
MYO – GE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabelle 9.8: Vergleich des Glukokortikoidrezeptorvorkommens in den verschiedenen Gewebeschichten. S = signifikant; ns = nicht signifikant

Vergleich	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3
OE – OSTR	s	s	ns	ns	ns	ns	ns
OE – TSTR	s	s	s	s	ns	s	ns
OE – GE	s	s	s	s	ns	ns	ns
OE – MYO	s	s	s	s	ns	ns	ns
OSTR – TSTR	s	ns	s	s	ns	ns	ns
OSTR – GE	s	s	s	s	ns	ns	ns
OSTR – MYO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TSTR – GE	ns	ns	ns	ns	ns	s	ns
TSTR – MYO	s	s	ns	ns	ns	s	ns
MYO – GE	s	s	s	ns	ns	ns	ns

9.4 Progesteronbestimmung

Tabelle 9.9: Progesteronbestimmung im peripheren Plasma von Tieren aus Gruppe B1 und B2

	B1 [ng/ml]	B2 [ng/ml]
Tier 1	1.10	5.90
Tier 2	2.30	3.60
Tier 3	3.20	0.40
Tier 4	0.80	5.40
Tier 5	1.30	6.20
Tier 6	0.80	-
Mittelwert	1.58	4.30

10 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen Personen, die mich in irgendeiner Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, im Besonderen sind dies:

- Prof. Dr. Alois Boos für das Überlassen des Dissertationsthemas, die Betreuung während den praktischen und theoretischen Arbeiten sowie für unzählige hilfreiche Hinweise bei der Literatursuche.
- PD Dr. Michael Hässig für die Übernahme des Korreferats sowie für die freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.
- Jocelyne Leclerc, Vesna Horvat und Erika Bohrer für die fachliche Unterstützung in allen Laborfragen.
- Dr. Martha Räber, Dr. Kristin Munzinger, Dr. Cam Ertugrul sowie den Doktorandinnen Diana Wehbrink, Kathrin Riner, Irene Weingart und Angela Pfister für die stets gute Stimmung im Team.
- Stefan Keller für seine wertvolle Hilfe in immunhistochemischen Fragen.
- Meiner Familie, die mir das Veterinärmedizinstudium ermöglicht hat und auf deren Unterstützung in allen Belangen ich mich immer verlassen konnte.
- Meiner Freundin Daniela Meier für ihre immerwährende Liebe und Unterstützung im letzten Jahr.

11 Lebenslauf

Personalien

Vorname, Name	Marcel Schäubli
Geburtsdatum	11. Mai 1977
Geburtsort	Winterthur
Nationalität	Schweizer
Heimatort	Bassersdorf/Nürensdorf ZH

Ausbildung

1984 - 1990	Primarschule, Wiesendangen
1990 -1993	Sekundarschule, Wiesendangen
1993 -1998	Wirtschaftsgymnasium, Winterthur
1998	Maturität Typus E
1998 - 2004	Studium der Veterinärmedizin, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
2004	Staatsexamen, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
2004 -2005	Doktorand, Institut für Veterinär-Anatomie, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich

Wiesendangen, 25. November 2005